



**Friedrich-Schiller-Universität Jena**

***Agonist-selektive Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Ratten-Somatostatin-Rezeptors 2A***

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Dipl.-Biol. Florian Pöll**

**geboren am 28.3.1980 in München**

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Schulz am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Uniklinikums Jena angefertigt.

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Stefan Schulz für die Überlassung eines sehr viel versprechenden Projektes und für die Möglichkeit zur Anfertigung einer Doktorarbeit. Besonders bedanke ich mich für seine jederzeit gewährte Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und das mir entgegengebrachte Vertrauen, vieles eigenständig ausprobieren zu dürfen.

Für hervorragende technische Assistenz möchte ich mich bei Heidrun Guder, Thomas Fischer und Heike Stadler bedanken.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen bedanke ich mich für die gute Atmosphäre. Insbesondere bei den Doktorandinnen und Doktoranden für die entgegengebrachte Kollegialität und Freundschaft.

Besonderer Dank gebührt auch Dr. Stefan Jacobs. Ich konnte viel von seiner Erfahrung profitieren, besonders bei Mutagenese-Vorhaben.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und die Möglichkeit, so viele Projekte kennen lernen zu dürfen. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Martin Lohse für die Flexibilität in der Übergangsphase.

Mein Dank gilt auch vielen Technikern, Umzugshelfern, und zahlreichen anderen Mitarbeitern der Universitäten Jena und Würzburg, die drei Laboreinrichtungen bzw. zwei Umzüge möglich gemacht haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Schulz und Frau PD Dr. Amelie Lupp möchte ich mich für das Lesen und Korrigieren der Arbeit im Zettelzustand bedanken. Mein Dank gilt auch den Gutachtern, die Ihre Zeit der Beurteilung des Endzustandes der Arbeit widmen.

Besonders bedanken möchte ich mich noch bei meiner Freundin Sonia Drozd, die mich unterstützt und nach Jena begleitet hat.

# Inhalt

<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Signalübertragung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren</b>	<b>5</b>
1.1.1 Regulation des GPCR-Membrantransports und der -Signalweiterleitung	6
1.1.2 Dephosphorylierung der desensitisierenden Phosphatreste	7
<b>1.2 Somatostatin</b>	<b>9</b>
1.2.1 Somatostatin Rezeptoren	10
1.2.2 Ratten Somatostatin Rezeptor <sub>2A</sub>	11
1.2.3 Stabile Somatostatin-Analoga	13
<b>1.3 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>16</b>
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Antikörper	16
2.1.3 Tiere	17
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>17</b>
2.2.1 Restriktion von DNA	17
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA aus Agarose-Gelen	18
2.2.3 Klonierung von DNA-Fragmenten in linearisierte Plasmidvektoren	18
2.2.4 Herstellung kompetenter Bakterien und Hitzeschock-Transformation	18
2.2.5 Plasmid-DNA-Amplifikation und -Präparation	19
2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.2.7 Fällung der DNA zur Überprüfung der cDNA-Konstrukte	20
<b>2.3 Biochemische Methoden</b>	<b>20</b>
2.3.1 Proteinbestimmung	20
2.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	20
2.3.3 Western-Blot-Analyse und Immundetektion	21
2.3.4 Dot-Blot-Analyse	22
2.3.5 Anreicherung der Rezeptorproteine mittels Weizenkeim-Lektin	22
2.3.6 Nachweis des Rezeptors aus dem Pankreas	23
2.3.7 Immunhistochemie an Hypophysenschnitten	23
<b>2.4 Zellkultur</b>	<b>24</b>
2.4.1 Kultivierung und transiente Transfektion von HEK293-Zellen	24
2.4.2 Stabile Transfektion von HEK-Zellen	24
2.4.3 Kultivierung und Transfektion von GH <sub>3</sub> -Zellen	24
2.4.4 Kultivierung von INS1-Zellen	25
2.4.5 Transfektion mit small interfering RNA (siRNA)	25
2.4.6 Zellbehandlung, -aufarbeitung und -lyse	25
2.4.7 Internalisierungs-ELISA	26
2.4.8 Immunocytochemie	26
2.4.9 Lebendzellaufnahmen von $\beta$ -Arrestin-EGFP	27
2.4.10 Konfokale Laser-scanning-Mikroskopie	27
<b>2.5 Datenauswertung</b>	<b>27</b>

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Agonist-selektive Phosphorylierung des rsst<sub>2A</sub>-Rezeptors</b>	<b>28</b>
3.1.1 Agonist-induzierte Rezeptor-Internalisierung	29
3.1.2 SOM230 induziert weder rsst <sub>2A</sub> -Phosphorylierung noch -Internalisierung	30
3.1.3 Die Phosphorylierung des <sup>353</sup> TTETQRT <sup>359</sup> -Motivs wird nicht durch Second-Messenger-aktivierte Kinasen vermittelt	33
3.1.4 GRK2 und GRK3 phosphorylieren das <sup>353</sup> TTETQRT <sup>359</sup> -Motiv Agonist-induziert	34
3.1.5 Das gesamte <sup>353</sup> TTETQRT <sup>359</sup> -Motiv wird phosphoryliert	36
3.1.6 Agonist-selektive Muster der rsst <sub>2A</sub> -Phosphorylierung	37
3.1.7 Die Agonist-induzierte Phosphorylierung reguliert die Internalisierung des rsst <sub>2A</sub>	38
3.1.8 SOM230 zeigt partialagonistische Eigenschaften	40
3.1.9 SS-14 und SOM230 induzieren unterschiedliche Muster der β-Arrestin-Translokation	41
3.1.10 Die ERK-Aktivierung wird über Gα <sub>i</sub> vermittelt und ist unabhängig von der rsst <sub>2A</sub> -Phosphorylierung	43
3.1.11 Die rsst <sub>2A</sub> -Internalisierung wird nicht nur durch die <sup>353</sup> TTETQRT <sup>359</sup> -Phosphorylierung reguliert.	45
<b>3.2 Die Phosphatase-vermittelte Dephosphorylierung des rsst<sub>2A</sub>-Rezeptors</b>	<b>47</b>
3.2.1 Der Phosphatase-Inhibitor Calyculin A, nicht aber Okadainsäure, blockt die rsst <sub>2A</sub> -Dephosphorylierung	47
3.2.2 Die katalytische Untereinheit β der Proteinphosphatase 1 vermittelt die Dephosphorylierung des rsst <sub>2A</sub>	50
<b>4 Diskussion</b>	<b>56</b>
<b>4.1 Agonist-selektive Phosphorylierung des rsst<sub>2A</sub>-Rezeptors am <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motiv</b>	<b>56</b>
4.1.1 Regulation der rsst <sub>2A</sub> -Internalisierung durch <sup>353</sup> TTETQRT <sup>359</sup> -Phosphorylierung	57
<b>4.2 Selektiver Agonismus am rsst<sub>2A</sub></b>	<b>61</b>
<b>4.3 SOM230 ist ein Partialagonist</b>	<b>63</b>
<b>4.4 Vermittlung der <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatase 1β</b>	<b>65</b>
<b>5 Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>6 Anhang</b>	<b>79</b>
<b>6.1 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>6.2 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>6.3 Antikörper</b>	<b>83</b>
6.3.1 Primäre Antikörper	83
6.3.2 Sekundäre Antikörper	83
<b>6.4 cDNA-Expressionskonstrukte</b>	<b>84</b>
<b>6.5 Primer</b>	<b>84</b>
<b>6.6 siRNA</b>	<b>85</b>
<b>6.7 Lebenslauf</b>	<b>86</b>
<b>6.8 Veröffentlichung</b>	<b>86</b>
<b>6.9 Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>87</b>



## Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen eine wichtige Proteingruppe pharmakologischer Zielstrukturen dar. Über den G-Protein-gekoppelten Somatostatin-Rezeptor 2A wird die Wirkung von Octreotid vermittelt, das bei Akromegalie und anderen neuroendokrinen Tumoren eingesetzt wird. Gegenwärtig befindet sich die Nachfolgesubstanz Pasireotid (SOM230) in klinischer Evaluation, welches als Pan-Somatostatin-Analogon hohe Affinitäten für vier der fünf Somatostatin-Rezeptoren besitzt und deswegen die klinische Einsetzbarkeit erweitert.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und ihre Signalweiterleitungen unterliegen vielfältigen Regulationsmechanismen wie der Phosphorylierung, Desensibilisierung und Internalisierung. Für den in dieser Arbeit genutzten Ratten-Somatostatin-Rezeptor 2A (rsst<sub>2A</sub>) ist bekannt, dass er nach Agonist-Bindung an einem Cluster von vier Carboxyl-terminalen Threoninen, dem <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motiv, phosphoryliert wird, woraufhin der Rezeptor internalisiert. Die Agonist-induzierte Phosphorylierung wird schnell dephosphoryliert und der Rezeptor kehrt binnen einer Stunde voll funktionsfähig an die Membran zurück.

In der vorliegenden Arbeit sollten die molekularen Mechanismen der Regulation des Ratten-Somatostatin-Rezeptors 2A (rsst<sub>2A</sub>) sowie Agonist-spezifische Effekte, insbesondere im Vergleich von Octreotid und SOM230, untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei phosphospezifische Antikörper generiert, die detaillierte Untersuchungen der Phosphorylierung des cytoplasmatischen <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motiv ermöglichten. Es konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass Octreotid und Somatostatin (SS-14) die Phosphorylierung aller vier untersuchten Threonine induzieren, auf die eine Internalisierung des rsst<sub>2A</sub> folgt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der rsst<sub>2A</sub> nach Bindung dieser Liganden relativ stabile Komplexe mit  $\beta$ -Arrestin bildet. SOM230, hingegen, induziert keine oder nur eine minimale Phosphorylierung, die keine  $\beta$ -Arrestin-Bindung sowie keine Rezeptor-Internalisierung herbeiführt. Außerdem wirkte es in der Anwesenheit von SS-14 oder Octreotid als Partialagonist. Es konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor nach SOM230-Bindung eine andere Konformation als nach der Bindung an einen

vollen Agonisten einnimmt. Die Unterschiede des Verhaltens von SOM230 und Octreotid könnten mehrere Konsequenzen für die klinische Anwendung der Substanzen haben.

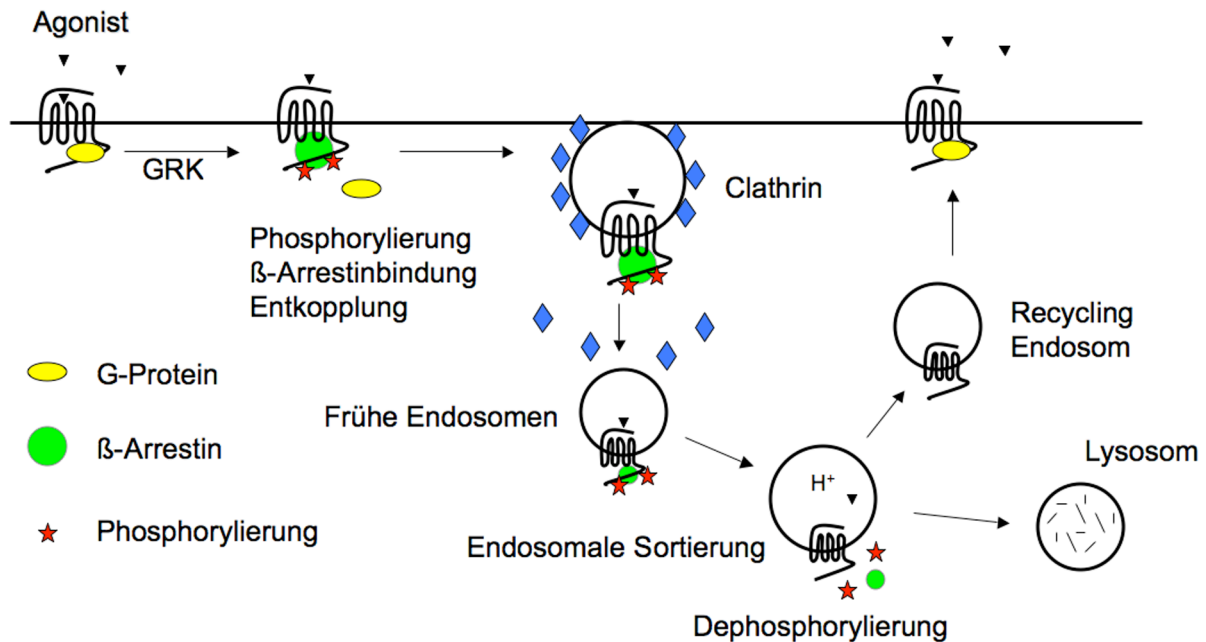
Mutationsstudien machten deutlich, dass die Phosphorylierung des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs essentiell für die Bindung von  $\beta$ -Arrestin ist, aber nicht für die rsst<sub>2A</sub>-Internalisierung. Diese wird allerdings durch die Phosphorylierung der Threonine reguliert bzw. verstärkt. Die Aktivität des Extrazellulär-Regulierte-Kinase(ERK)-Signalwegs scheint ebenfalls durch die Phosphorylierung reguliert zu werden.

Zudem ist es in dieser Arbeit zum ersten Mal gelungen, eine Phosphatase zu identifizieren, welche die Agonist-induzierte Phosphorylierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors abspaltet: Die  $\beta$ -Isoform der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatase 1 (PP1C $\beta$ ) dephosphoryliert das untersuchte <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motiv. Bislang gab es nur indirekte Hinweise auf die Aktivität verschiedener Phosphatasen an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Identifikation einer spezifischen Untereinheit führt noch einen Schritt weiter. Dies könnte der Anfangspunkt zum tiefergehenden Verständnis der molekularen Mechanismen der Resensibilisierung und des Recycling des rsst<sub>2A</sub> und anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sein.

# 1 Einleitung

## 1.1 Signalübertragung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) ist mit mindestens 1000 kodierten Genen (Mammalia) die größte Gruppe von Signalproteinen (Kohout und Lefkowitz 2003; Shukla, Violin et al. 2008). Sie beinhaltet Rezeptoren für Hormone, Neurotransmitter, Chemokine und Calcium-Ionen, sowie auch sensorische Rezeptoren für zahlreiche Geruchsstoffe, bitteren und süßen Geschmack und Photonen (Pierce, Premont et al. 2002). Gemeinsam ist Ihnen der Aufbau mit einem extrazellulären Amino-Terminus und einem intrazellulären Carboxyl-Terminus sowie sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen, welche durch drei intrazelluläre Schleifen und drei extrazelluläre Schleifen verbunden sind (Lohse 1993; Heilker, Wolff et al. 2009). Aus diesem Grund werden GPCRs auch Siebentransmembranrezeptoren (7TM) genannt. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren übertragen einen extrazellulären Stimulus auf intrazelluläre heterotrimere G-Proteine (Abb. 1), welche aus drei Untereinheiten, der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit, aufgebaut sind (Pierce, Premont et al. 2002). Die  $G\alpha$ -Untereinheit, von der es 21 Varianten im Menschen gibt, fungiert als molekularer Schalter. Inaktiv ist  $G\alpha$  an Guanosin-5'-diphosphat (GDP) gebunden. Wird der GPCR aktiviert, wird das GDP am  $G\alpha$  durch Guanosin-5'-triphosphat (GTP) ausgetauscht, welches durch die GTPase-Aktivität der  $G\alpha$ -Untereinheit gespalten wird und verschiedene Signalweiterleitungen in der Zelle bewirkt. Ein bestimmter GPCR bindet dabei nur spezifische G-Proteine inklusive  $G\alpha$ -Untereinheiten, welche eine für den Rezeptor spezifische Signalweiterleitung bewirken (Lodish 2004; Oldham und Hamm 2008; Park, Lodowski et al. 2008). Aber auch auf der Ebene des Rezeptors kommt es zu einer vielfältigen Regulation der Signalweitergabe. Dessen Ansprechen auf Agonist-Stimulation wird entscheidend durch Desensitisierung, Internalisierung und Downregulierung der Rezeptorproteine beeinflusst (Abb. 1). Der initiale Schritt für diese drei Prozesse ist die Agonist-induzierte Phosphorylierung des Rezeptors.



**Abb. 1: Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.** Durch Bindung eines extrazellulären Liganden wird das G-Protein aktiviert. Darauf kommt es durch spezifische G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinasen (GRKs) zur Phosphorylierung des Rezeptors an dessen intrazellulären Anteilen. β-Arrestin bindet an Phosphat-Cluster, rekrutiert andere Proteine und fördert so die Clathrin-vermittelte Internalisierung des Rezeptors in frühe Endosomen. Die Phosphorylierung und die β-Arrestin-Bindung führen zu einer Verminderung des G-Protein-vermittelten Signals – Diese Prozesse werden unter Desensibilisierung zusammengefasst. Die Phosphorylierung wird wieder entfernt – möglicherweise durch bisher nicht bekannte Phosphatasen oder durch das saure Milieu innerhalb der Endosomen. Der internalisierte Rezeptor wird endosomal sortiert: Sein molekularer Aufbau führt entweder zur funktionsfähigen Rückkehr an die Membran, dem Recycling, oder das Endosom wird zu einem Lysosom und der Rezeptor wird abgebaut (Degradation).

### 1.1.1 Regulation des GPCR-Membrantransports und der -Signalweiterleitung

Die Agonist-induzierte Phosphorylierung der intrazellulären Rezeptoranteile wird entweder durch spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRK) oder auch seltener heterolog durch *Second-Messenger*-aktivierte Kinasen wie Proteinkinase A (PKA) oder Proteinkinase C (PKC) vermittelt, die allesamt zu den Serin/Threonin-Kinasen gehören (Krupnick und Benovic 1998; Pierce, Premont et al. 2002; Hanyaloglu und Zastrow 2008; Marchese, Paing et al. 2008). Bei der Agonist-induzierten Phosphorylierung nimmt der Rezeptor erst durch die Agonist-Bindung eine Konformation ein, die als Substrat der GRKs (bei Vernachlässigung der heterologen Phosphorylierung) dienen kann. Diese Phosphorylierung bildet den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Bindung von β-Arrestin an den Rezeptor und somit auch für dessen Desensibilisierung und Internalisierung (Kohout

und Lefkowitz 2003; Premont und Gainetdinov 2007). Die Desensibilisierung entspricht der Inhibition der Signalweitergabe, die bis zu einer Verringerung von 80 % des G-Protein-vermittelten Signals führen kann (Lohse 1993; Kohout und Lefkowitz 2003). Die Internalisierung entspricht der Endocytose des Rezeptors, der auf diese Weise der endosomalen Sortierung zugeführt wird (Hanyaloglu und Zastrow 2008). Beide sind physiologisch sehr wichtige Prozesse, die bei fast allen untersuchten GPCRs gefunden wurden und die den klassisch bekannten Aufgaben der  $\beta$ -Arrestine, von denen es zwei Varianten gibt, die außerhalb des visuellen Systems exprimiert werden ( $\beta$ -Arrestin-1 und -2), entsprechen. Seit wenigen Jahren finden sich aber immer weiter reichende Funktionen der Arrestine, zu denen die G-Protein-unabhängige Signaltransduktion, die Funktion als Gerüstprotein, welches Signalproteine wie ERK, JNK, p38, Akt und PI3-Kinase in die Nähe der GPCRs bringt und sogar nukleäres Signalprotein, gehören (Lefkowitz und Shenoy 2005; DeWire, Ahn et al. 2007; Beaulieu, Marion et al. 2008; Dewire, Kim et al. 2008; Shukla, Violin et al. 2008). Nach der Internalisierung kann der Rezeptor, je nach seinen molekularen Determinanten, recycelt werden, d.h. wieder funktionell an die Membran zurückgelangen, oder in Lysosomen transportiert werden, wo er abgebaut wird (Luttrell und Lefkowitz 2002; Hanyaloglu und Zastrow 2008).

### 1.1.2 Dephosphorylierung der desensibilisierenden Phosphatreste

Angesichts der Vielfalt der physiologischen Funktionen und der ubiquitären Verteilung der Sieben-Transmembran-Rezeptoren ist die Konservierung der molekularen Mechanismen, die deren Signalübertragung und -modulation regulieren, bemerkenswert (Lefkowitz 2000). Die drei Proteinfamilien der heterotrimeren G-Proteine, der GRKs und der Arrestine sind seit Jahrzehnten an vielen Rezeptormodellen untersucht worden. Dennoch blieb lange Zeit unbeachtet, wie die durch die GRK vermittelte Phosphorylierung wieder entfernt wird, obwohl schon vor über 15 Jahren in *Drosophila melanogaster* eine Phosphatase (Retinale Degeneration C, RDGC) die für die Rhodopsin-Dephosphorylierung notwendig ist, identifiziert wurde. RDGC weist im Bereich der katalytischen Domäne eine hohe Sequenz-Homologie mit den Serin/Threonin-Proteinphosphatasen 1 (PP1), 2A (PP2A)

und 3 (PP3/PP2B) auf (Steele, Washburn et al. 1992; Byk, Bar-Yaacov et al. 1993; Vinos, Jalink et al. 1997). Bei Verlust von RDGC wird der Abbruch der Weiterleitung des Lichtsignals gestört und es kommt zu lichtabhängigen retinalen Degeneration (Vinos, Jalink et al. 1997).

Weiterhin wurde eine PP2A-verwandte Phosphatase entdeckt, die nur im sauren Milieu der Endosomen den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor dephosphorylieren kann und ebenfalls mit der vesikulären Membran assoziiert ist. Sie wurde G-Protein-gekoppelte Rezeptor Phosphatase (GRP) genannt (Pitcher, Payne et al. 1995; Krueger, Daaka et al. 1997). Diese Daten würden erklären, warum der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor internalisiert werden muss, um zu resensibilisieren (Krueger, Daaka et al. 1997). Dieser Befund wurde allerdings in Zweifel gezogen, da sich durch die Inhibition der Internalisierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors – durch eine dominant-negative Dynamin-Mutante oder eine hypertone Saccharose-Lösung – die Dephosphorylierungsrate nicht verändert. Das konnte sowohl für ein PKA-phosphoryliertes Serin in der dritten intrazellulären Schleife als auch für zwei GRK-phosphorylierte Serine am C-Terminus nachgewiesen werden (Iyer, Tran et al. 2006; Kelly 2006).

Auch am  $D_1$ -Dopamin-Rezeptor wurde überprüft, ob die These einer für die Dephosphorylierung notwendige Rezeptor-Internalisierung zutrifft und konnte nicht bestätigt werden: Erstens konnte die Rezeptor-Dephosphorylierung nicht gehemmt werden, indem die Rezeptor-Internalisierung durch Behandlung mit dem pflanzlichen Lectin Concanavalin A sowie auch Saccharose verhindert wurde (Gardner, Liu et al. 2001). Zweitens gilt das Gleiche für die Anwendung der Phosphatase-Inhibitoren Okadainsäure (OA), welches die GRP-Aktivität blocken kann, sowie Calyculin A, welches ebenfalls die Dephosphorylierung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors inhibiert (Pippig, Andexinger et al. 1995; Pitcher, Payne et al. 1995; Krueger, Daaka et al. 1997; Gardner, Liu et al. 2001). Da die Dephosphorylierung sehr schnell und auch in keinem speziellem Kompartiment, welches durch pH-Veränderungen eine Destabilisierung der kovalenten Bindung zwischen Phosphatrest und Rezeptor verursachen könnte, stattfindet, wurde inzwischen für den  $\beta_2$ -adrenergen, den  $D_1$ -Dopamin-, den Parathormon (PTH)- und den  $V1a$ -Vasopressin-Rezeptor dephosphorylierende Phosphatasen postuliert. In keinem dieser Fälle konnte eine

Rezeptor-dephosphorylierende Phosphatase identifiziert werden (Innamorati, Sadeghi et al. 1998; Gardner, Liu et al. 2001; Chauvin, Bencsik et al. 2002; Iyer, Tran et al. 2006; Tran, Friedman et al. 2007). Für die Dephosphorylierung des Thromboxan-Rezeptors (TP) wurden lediglich durch Inhibitor-Studien PP1, PP2A oder Verwandte dieser Phosphatasen als notwendig postuliert (Spurney 2001).

In weiteren Arbeiten wurde ein Signalkomplex, bestehend aus  $\beta$ -Arrestin-2, der Serin/Threonin-Kinase Akt und PP2A, nachgewiesen, welcher die Signalweitergabe des Dopamin-Rezeptors 2 (D2R) reguliert.  $\beta$ -Arrestin-2 fungiert als Gerüst, Akt als *Second-Messenger*, welcher von der PP2A dephosphoryliert wird (Beaulieu, Sotnikova et al. 2005; DeWire, Ahn et al. 2007; Beaulieu, Marion et al. 2008). Ob die PP2A auch den D2R dephosphoryliert, wurde nicht untersucht. Kürzlich wurde auch eine direkte Interaktion der PP2A mit dem C-Terminus des GPR54/Kiss-1-Rezeptors gefunden, der für die Geschlechtsreife von Säugetieren bedeutsam ist, ohne dass die Dephosphorylierung am Rezeptor untersucht wurde (Evans, Wang et al. 2008).

## 1.2 Somatostatin

Somatostatin ist ein Zylopeptid, welches in einer längeren Form mit 28 Aminosäuren (SS-28) und in einer mit 14 Aminosäuren (SS-14) aus dem Vorläufer Prosomatostatin gebildet wird. Es wurde ursprünglich als neuroendokrines Hormon des Hypothalamus entdeckt, welches eine hemmende Wirkung auf die Sekretion des Wachstumshormons des Hypophysenvorderlappens ausübt (Brazeau, Vale et al. 1973). Somatostatin wird aber nicht nur von weiteren endokrinen Zellen, sondern auch von gastrointestinalen Zellen, Immunzellen, zentralen und peripheren neuronalen Zellen und einigen Tumoren produziert. Es reguliert so die Neurotransmission, das Zellwachstum und die Ausschüttung einiger nachgeschalteter Hormone, wie dem Adrenocorticotropen Hormon (ACTH), dem Wachstumshormon (GH), Thyreotropin/Thyreoida-stimulierendes Hormon (TSH), Glucagon, Insulin, Gastrin und Ghrelin. Insgesamt wirkt Somatostatin fast ausschließlich inhibitorisch (Weckbecker, Lewis et al. 2003; Stumm, Zhou et al. 2004).

### 1.2.1 Somatostatin Rezeptoren

Die physiologischen Effekte von Somatostatin werden durch sechs G-Proteingekoppelte Rezeptoren,  $sst_1$ - $sst_5$ , vermittelt. Von dem  $sst_2$ -Rezeptor existieren bei Maus und Ratte zwei Spleißvarianten,  $sst_{2A}$  und  $sst_{2B}$ . Der  $sst_{2B}$  (332 AS) ist eine C-terminal um 37 Aminosäuren (AS) verkürzte Version des  $sst_{2A}$  (369 AS). Im Menschen wurde bislang nur die längere Variante nachgewiesen (Fischer, Doll et al. 2008; Liu, Dewi et al. 2008). Alle diese Rezeptoren binden hochaffin (im Sub-nM-Bereich) SS-14, SS-28 und das eng verwandte Cortistatin (Lahlou, Guillermet et al. 2004; Broglio, Papotti et al. 2007). Sie sind an inhibitorische  $G_{\alpha_i}$ -Proteine gekoppelt, was primär zu einer Hemmung der Adenylatcyclase (AC) und somit zu der Verringerung des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) im Cytosol führt. Ansonsten haben die verschiedenen Subtypen ein sehr unterschiedliches Signalverhalten, welches auch Agonist-abhängig ist (Lahlou, Guillermet et al. 2004; Schonbrunn 2008). Auch die physiologische Regulation nach Agonistgabe variiert trotz großer struktureller Ähnlichkeiten je nach Subtyp, Spezies, Agonist und untersuchtem Zelltyp. Der Ratte- $sst_1$  ( $rsst_1$ ) internalisiert im Gegensatz zum humanen  $sst_1$  ( $hsst_1$ ) nach Agonistgabe, ohne  $\beta$ -Arrestin-1 oder -2 an die Membran zu translozieren (Patel 1999; Tulipano, Stumm et al. 2004; Tulipano und Schulz 2007). Der humane ( $hsst_2$ ) sowie auch die Ratten-Somatostatin Rezeptor 2 ( $rsst_{2A}$ ) werden phosphoryliert, rekrutieren überexprimiertes  $\beta$ -Arrestin-2 an die Zellmembran, internalisieren Clathrin-abhängig und recyceln komplett (Tulipano, Stumm et al. 2004; Jacobs und Schulz 2008; Lesche, Lehmann et al. 2009). Der  $sst_2$  ist der am besten untersuchte Somatostatin-Rezeptor. Seine Expression ist weiter verbreitet als die anderer Subtypen und auch in Tumoren, in denen meist mehr als eine  $sst$ -Variante exprimiert wird, ist der  $sst_{2A}$  vorherrschend (Guillermet-Guibert, Lahlou et al. 2005; Liu, Cescato et al. 2005). Auch der humane und der Ratten- $sst_3$  ( $rsst_3$ ) werden Agonist-induziert phosphoryliert und Clathrin-abhängig internalisiert. Für den  $rsst_3$  wurde auch die Translokation der beiden Arrestine vom Cytoplasma an die Plasmamembran gezeigt. Der  $rsst_3$  wird tiefgreifend anders endosomal sortiert als der  $rsst_{2A}$ : Nur ein kleiner Teil des Rezeptors wird recycelt, während der größere Anteil degradiert wird. Ein Vorgang der durch den Lysosomen-Inhibitor-Chloroquin

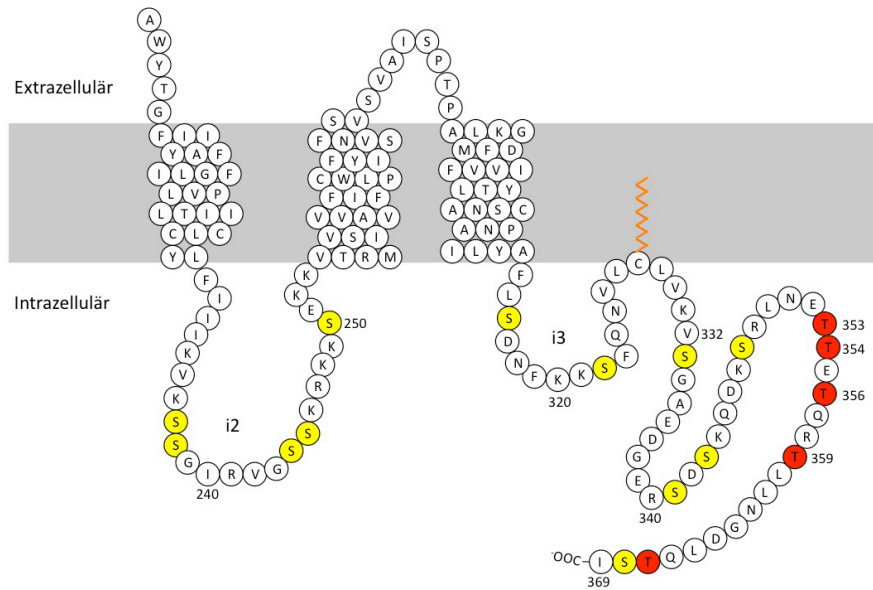


und den Proteosom-Inhibitor MG132 geblockt wird. Zudem wird der sst<sub>3</sub>, wieder im Gegensatz zum sst<sub>2</sub>, an mehreren Stellen ubiquitinyliert. Die zugrunde liegenden molekularen Unterschiede der beiden Rezeptoren sind nicht bekannt. Der Ratten Somatostatin-Rezeptor 4 (rsst<sub>4</sub>) wird trotz vorhandener Phosphorylierungsstellen nach SS-14-Behandlung nicht phosphoryliert, bewirkt keine Umverteilung von  $\beta$ -Arrestin und internalisiert auch nicht (Tulipano, Stumm et al. 2004). Der sst<sub>5</sub> indes zeigt in Mensch und Ratte als einziger sst-Subtyp eine höhere Affinität zu SS-28 als zu SS-14. Auch nur das Erstere vermag den sst<sub>5</sub>-Rezeptor, der keine intrazellulären Phosphorylierungsstellen-Cluster besitzt, zu internalisieren (Tulipano, Stumm et al. 2004; Cescato, Schulz et al. 2006).

Die Expression der sst-Rezeptoren ergibt kein minder komplexes Bild: Verteilt über den gesamten Organismus inklusive dem zentralen Nervensystem ergibt sich für jeden Subtyp ein charakteristisches, wenngleich auch oftmals überlappendes, Expressionsmuster, welches auch von Spezies zu Spezies variiert (Patel 1999).

### **1.2.2 Ratten Somatostatin Rezeptor<sub>2A</sub>**

Der rsst<sub>2A</sub> wird nach Somatostatin-Exposition durch die GRK2 an Threoninen des C-terminalen Endes phosphoryliert (Abb. 2). Daraufhin internalisiert der Rezeptor zusammen mit  $\beta$ -Arrestin in frühe Endosomen, was auf eine stabile Komplexbildung schließen lässt (Hipkin, Friedman et al. 1997; Tulipano, Stumm et al. 2004). Dieses Verhalten wird so genannten Klasse B-Rezeptoren zugeschrieben, die wegen der starken Bindung an  $\beta$ -Arrestin nur langsam recycelt werden. Die Klasse A-Rezeptoren bilden nur instabile Komplexe mit  $\beta$ -Arrestin, internalisieren ohne dieses, und resensibilisieren schnell (Oakley, Laporte et al. 2001; Moore, Milano et al. 2007). Der rsst<sub>2A</sub> wird trotz der festen Bindung innerhalb von 60 min (nach Agonist-Behandlung) wieder vollständig zur Plasmamembran zurücktransportiert (Tulipano, Stumm et al. 2004). Auch in Neuronen konnte die schnelle rsst<sub>2A</sub>-Internalisierung mit  $\beta$ -Arrestin und das rasche Recyclen des Rezeptors nachgewiesen werden (Lelouvier, Tamagno et al. 2008).



**Abb. 2: Der Carboxyl-Terminus des rsst<sub>2A</sub>.** Schematische Darstellung der intrazellulären Phosphorylierungsstellen des rsst<sub>2A</sub>. Die Threonine sind *rot* unterlegt, die Serine *gelb* und die Palmitoylierung ist *orange* dargestellt. Die intrazellulären Schleifen sind mit i2 bzw. i3 gekennzeichnet. Zu beachten ist das Threonin-Cluster von AS 353 – 359. Gestaltet nach Liu et al. 2008.

Mit radioaktiven Ganz-Zell-Phosphorylierungs-Studien konnte gezeigt werden, dass beim Fehlen der letzten 20 AS (Trunktionsmutante rsst<sub>2A</sub>-349X) die Agonist-induzierte Phosphorylierung um 80 % gesenkt wird. Eine andere Rezeptormutante, bei der die Threoninreste 353, 354 und 356 gegen Alanin ausgetauscht wurden, konnte nur noch zu 55 % phosphoryliert werden. Diese beiden rsst<sub>2A</sub>-Mutanten konnten cytosolisches  $\beta$ -Arrestin nicht mehr an die Membran rekrutieren. Allerdings internalisiert die trunkierte Mutante konstitutiv – also ohne Agonistexposition und Phosphorylierung in HEK-Zellen. Eine Trunktionsmutante, der die C-terminalen 44 AS fehlen (rsst<sub>2A</sub>-325X) internalisiert wiederum nur Agonist-induziert (Schwarkop, Kreienkamp et al. 1999).

Neuere Mutationsstudien zeigen, dass der Rezeptor, wenn sämtliche Serine und Threonine (Ser-/Thr-), die allesamt gegen Alanine ausgetauscht wurden, fünffach verlangsamt internalisiert und keine  $\beta$ -Arrestin-Bindung mehr entsteht. Das gleiche Verhalten zeigen Mutanten ohne die Threonine (Thr-). Die Mutante ohne Serine (Ser-) hingegen, zeigte keine Unterschiede zum Wildtyp-rsst<sub>2A</sub> bei der Internalisierung oder der  $\beta$ -Arrestin-Bindung, konnte dafür aber, gemessen als Inhibition der Adenylatcyclase-Aktivität, nicht desensibilisieren (Liu, Dewi et al. 2008). Von der gleichen Gruppe konnte dann auch mittels phosphospezifischer Antikörper eine SS-14-induzierte GRK2-vermittelte Phosphorylierung von Ser<sup>341</sup>, Ser<sup>343</sup>, Ser<sup>348</sup>, Thr<sup>353</sup> und Thr<sup>354</sup> nachgewiesen werden (Liu, Bee et al. 2009).

### **1.2.3 Stabile Somatostatin-Analoga**

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen die größte Gruppe von Proteinen dar, die Ziel von pharmakologischen Substanzen ist (Premont und Gainetdinov 2007). Auch der  $\text{sst}_{2A}$ , der in Zellen von pankreatischen, gastrointestinalen und pulmonalen neuroendokrinen Tumoren, Hypophysenadenomen, Mammakarzinomen, Meningeomen, Neuroblastomen, Medulloblastomen, Phäochromozytomen und Paragangliomen exprimiert wird, hat sich als pharmakologische Zielstruktur bewährt (Weckbecker, Lewis et al. 2003; Fischer, Doll et al. 2008). Zudem wurde gezeigt, dass Somatostatin die Sekretion von beispielsweise Wachstumshormon, Insulin und Glucagon, und das Wachstum einiger Neuroendokriner Tumore (NETs) inhibiert (Reubi 1997; Jacobs und Schulz 2008). Da Somatostatin im menschlichen Serum nur wenige Minuten stabil ist, wurden stabile Somatostatin-Analoga entwickelt, die klinisch für Tumor-Bildgebung und -Behandlung eingesetzt werden (Weckbecker, Lewis et al. 2003; Fischer, Doll et al. 2008).

#### **1.2.3.1 Octreotid**

Das Somatostatin-Analogon Octreotid (Sandostatin<sup>®</sup>, Novartis Pharmaceuticals) wird für die Behandlung von NETs wie Wachstumshormon-sekretierenden Adenomen und Karzinoiden eingesetzt (Donangelo und Melmed 2005; Oberg 2005). Am Anfang der Behandlung kontrolliert Octreotid bei 90 % der Patienten die durch hormonelle Überproduktion hervorgerufenen Symptome wie Diarrhö und Flush-Symptomatik. Jedoch nach einjähriger Anwendung entwickeln ca. 50 % der Patienten eine Resistenz (Saslow, O'Brien et al. 1997; Oberg 2005; Asnacios, Courbon et al. 2008; Lesche, Lehmann et al. 2009). Eine Studie (PROMID) zeigt, dass Octreotid bei neuroendokrinen Mitteldarmtumoren die Tumorprogression verlangsamt (Rinke, Muller et al. 2009). Bei Akromegalie normalisiert Octreotid die Wachstumshormonlevel nur bei 65 % der Patienten, wobei die Wirksamkeit eindeutig mit der Präsenz des  $\text{sst}_2$ -Rezeptors zusammenhängt, die im Laufe der Octreotid-Behandlung weiter abnimmt, während die Expression von  $\text{sst}_5$  stabil bleibt (Plockinger, Albrecht et al. 2008). Beim zentralen Cushing-Syndrom hat Octreotid keine senkende Wirkung auf die Ausschüttung des ACTHs aus dem Hypophysenvorderlappen, da auf den

sekretierenden Zellen hauptsächlich der  $sst_5$  vorhanden ist (van der Hoek, de Herder et al. 2004; Lesche, Lehmann et al. 2009).

### **1.2.3.2 Pasireotid (SOM230)**

Pasireotid (SOM230) ist derzeit als Nachfolgesubstanz von Octreotid zur Behandlung von Akromegalie, Cushing-Syndrom und Karzinoidtumoren in klinischer Entwicklung. Octreotid bindet nur den  $sst_{2A}$  mit subnanomolarer Affinität. SOM230, das erstmals 2002 beschrieben wurde, bindet sowohl den  $sst_2$  als auch an  $sst_1$ ,  $sst_3$  und  $sst_5$  hochaffin und damit vier der fünf humanen Somatostatin-Rezeptoren (Bruns, Lewis et al. 2002; Weckbecker, Briner et al. 2002; Lewis, Bauer et al. 2003). Allerdings ist die Affinität von SOM230 für den  $sst_2$ -Rezeptor im Vergleich zu Octreotid verringert (Schmid und Silva 2005). Jedoch ist die Eliminationshalbwertszeit von SOM230 (11 bzw. 11,8 h) bis siebenfach länger als die von Octreotid (1,5 bzw. 2,3 h) (Ma, Wang et al. 2005; Schmid und Silva 2005). An einem transgenen Maus-Modell, das Wachstumshormon- und Prolaktin-sekretierende Hypophysen-Adenome entwickelt, wurde die Wirkung von Octreotid und SOM230 verglichen. Während Octreotid zur Abschwächung der Tumorprogression und gleich bleibenden Prolactin-Level im Serum der Tiere führte, induzierte SOM230 eine deutliche Tumorregression und eine Abnahme der Prolaktin-Sekretion (Fedele, De Martino et al. 2007).

Präklinische Studien zeigen, dass SOM230 einige Vorteile gegenüber Octreotid haben könnte. Es inhibiert stärker und lang anhaltender die Wachstumshormon/Insulin-like-growth-factor-1 (GH/IGF-1)-Achse als Octreotid (Weckbecker, Briner et al. 2002; Schmid 2008). Im Gegensatz zu Octreotid- kann SOM230-Behandlung bei Patienten mit corticotropen Adenomen, also primärem Cushing-Syndrom, die ACTH-Ausschüttung und das Zellwachstum senken und ist somit ein vielversprechendes Medikament für diese Patienten (Schmid 2008; de Bruin, Feelders et al. 2009).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ein Ziel der Arbeit war es, die molekularen Mechanismen der Regulation des Ratten-Somatostatin-Rezeptors 2A (rsst<sub>2A</sub>) zu untersuchen. Hierzu sollten phosphospezifische Antikörper generiert werden, die weiterführende Versuche an der Agonist-induzierten Phosphorylierung des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs ermöglichen. Für diesen Phosphorylierungs-Cluster sollten phosphorylierende Kinasen und vermutete dephosphorylierende Phosphatasen identifiziert werden. Des Weiteren sollte die physiologische Funktion dieser Phosphorylierung beim Membrantransport und der Signalweitergabe des rsst<sub>2A</sub> untersucht werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war, verschiedene rsst<sub>2A</sub>-Agonisten auf eventuelle Unterschiede in der Rezeptoraktivierung und -regulation zu überprüfen. Dies galt insbesondere für Octreotid und dessen Nachfolgesubstanz Pasireotid (SOM230).

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Chemikalien**

Sämtliche Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen: Applichem, Biozym, Boehringer/Roche, Clontech, Gibco, Invitrogen, Roth, Sigma-Aldrich und VWR. Sie wurden in der Qualität pro analysi (p.a.) eingesetzt. Spezielle Chemikalien und verwendete Lösungen werden bei den jeweiligen Methodenbeschreibungen angegeben. Die Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (Milli-Q<sup>®</sup>, Millipore), welches für molekularbiologische Arbeiten zusätzlich autoklaviert wurde (Laboclav<sup>®</sup>, SHP Steriltechnik), hergestellt.

SOM230 und Octreotid wurden von Dr. Herbert Schmid (Novartis), L-779,976 von Dr. Susan Rohrer (Merck) und BIM-23627 von Dr. Michael Culler (IPSEN) bereitgestellt.

#### **2.1.2 Antikörper**

Die Generierung und Charakterisierung des Phosphorylierungs-unabhängigen monoklonalen Kaninchen-Antikörpers anti-sst2A (UMB-1) sowie des polyklonalen Kaninchen-Antikörpers anti-T7 wurde in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe publiziert (Pfeiffer, Koch et al. 2001; Pfeiffer, Koch et al. 2002; Fischer, Doll et al. 2008). Das phosphospezifische polyklonale anti-psst2A-Serum wurde gegen das folgende Peptid, das den AS 349-363 des rsst<sub>2A</sub> entspricht, und vier phosphorylierte Threonine enthält, generiert: RLNE(pT)(pT)E(pT)QR(pT)LLNG. Das Peptid wurde HPLC-gereinigt und an das *Keyhole-Limpet-Hemocyanin*-Protein des Zitteraals gekoppelt. Das Konjugat wurde 1:1 mit Freuds Adjuvant verdünnt und in vier Kaninchen (Nr. 0520-0524) im Vier-Wochen-Rhythmus injiziert. Das Serum wurde von der zweiten Injektion an gewonnen. Die Spezifität des Serums wurde mittels Dot-Blot-Analyse überprüft. Um das <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motiv genauer untersuchen zu können, wurde das anti-sst2A-Serum mit den Peptiden RLNE(pT)(pT)ETQRTLLNG

und RLNETTE(pT)QR(pT)LLNG mit Hilfe des SulfoLink Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben affinitätsgereinigt.

Eine Liste der zum Einsatz gekommenen Primär- und Sekundär-Antikörper findet sich im Anhang unter 6.3.

### 2.1.3 Tiere

Für tierexperimentelle Daten dieser Arbeit wurden männliche Rattus Norvegicus des Stammes Wistar aus der Züchtung des Uniklinikums Jena verwendet. Die Tierexperimentellen Bestimmungen der Universität Jena sowie diejenigen Deutschlands wurden eingehalten.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden entsprechend den ausführlich in der Fachliteratur beschriebenen Standardmethoden durchgeführt. Als Beispiel sei die Methoden-Sammlung *Short Protocols in Molecular Biology* erwähnt (Ausubel 2002). Bei der Anwendung von Kits wurde den Angaben des Herstellers gefolgt. Im Folgenden sollen die Methoden und insbesondere deren Änderungen beschrieben werden.

### 2.2.1 Restriktion von DNA

Zum Verdau von DNA-Plasmiden sowie DNA-Fragmenten wurden verschiedene Restriktionsenzyme von Fermentas und NEB nach Angaben der Hersteller eingesetzt. Alle hier eingesetzten Restriktionsverdau wurden bei 37 °C für 1-3 h inkubiert. Zum einen wurde diese Technik angewandt, um Subklonierungen bei Vektoren mit identischen Schnittstellen durchzuführen, oder auch um die DNA, beispielsweise nach einer Plasmid-Präparation, in einem analytischen Gel zu überprüfen.

### 2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Die Trennung und Größenbestimmung von linearisierter DNA für analytische und präparative Zwecke erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese mit 0,8%- bis 1,5%igen (Gew. %) Agarose-Gelen mithilfe von Ethidiumbromid (0,07 Vol. %). Die DNA wurde vor dem Laden in die Geltaschen mit 5x DNA-Probenpuffer gemischt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer (50 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) verwendet. An die Gelelektrophorese-Kammern DNA Sub Cell™ (Bio-Rad) wurde durch das Power Pac HC (Bio-Rad) eine Spannung von bis zu 100 mV angelegt. Die DNA wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht, ausgeschnitten und mittels des peqGOLD® Gel Extraction Kits (Peqlab) eluiert.

### 2.2.3 Klonierung von DNA-Fragmenten in linearisierte Plasmidvektoren

Zunächst wurden das DNA-Fragment und der Vektor wie oben beschrieben geschnitten und aus einem präparativen Agarose-Gel eluiert. Für die Ligation wurden 2,5 U der T4-DNA-Ligase (Invitrogen) auf 10 µl Reaktionsansatz gegeben. Der Reaktionsansatz enthielt Vektor und Insert in einem Verhältnis von annähernd 1:3 (bezogen auf die Molekülzahl). Die Inkubation erfolgte für 12 – 14 h bei 18 °C. Eine Übersicht der eingesetzten Expressionsvektoren findet sich im Anhang.

### 2.2.4 Herstellung kompetenter Bakterien und Hitzeschock-Transformation

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden zuerst 4 ml Übernachtskulturen angeimpft, diese mit 400 ml LB-Medium verdünnt und ca. 2 h, bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,6 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Danach wurde die Kultur 5 min in Eiswasser abgekühlt, bei 4000x g in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C 10 min pelletiert und das Pellet mit eiskaltem Puffer (100 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Daraufhin wurde die Suspension 30 min auf Eis inkubiert und wiederum bei 4000x g bei 4 °C 10 min zentrifugiert und das Pellet in 4 ml eiskaltem Calciumchlorid-Puffer (100 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 Vol. % Glycerol) resuspendiert. Die Zell-Lösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.



Für die Hitzeschocktransformation wurden 50 µl der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut, 1 µg Plasmid-DNA dazugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte durch einminütiges Erwärmen im Wasserbad auf 42 °C. Danach folgten nochmals 2 min auf Eis. Je nach Selektionsantibiotikum wurden die E. coli gleich auf Agarplatten (LB Agar, Invitrogen) mit 100 µg Ampicillin pro ml Agar ausgestrichen bzw. bei Plasmiden mit Kanamycin-Resistenz wurden die Bakterien vor dem Ausstreichen auf Agarplatten mit 50 µg Kanamycin pro ml Agar bei 37 °C 1 h in LB-Medium ohne Antibiotikum bei geschüttelt.

### 2.2.5 Plasmid-DNA-Amplifikation und -Präparation

Von auf Selektionsagar gewachsenen Kolonien wurden 2-ml-Übernachtskulturen mit LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum angelegt. Die DNA wurde aus diesen durch ein modifiziertes Protokoll der alkalischen Lyse präpariert (Birnboim und Doly 1979): Die Bakterien wurden pelletiert, in 300 µl P1-Puffer resuspendiert, mit 300 µl P2-Puffer versetzt und nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) mit 300 µl P3-Puffer neutralisiert. Es folgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis und anschließendes Zentrifugieren bei 13000x g für 10 min. Zum Überstand wurde Isopropanol in einem Verhältnis von 1:0,75 gegeben und dann 10 min inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000x g für 15 min. Das Plasmid-DNA-Pellet wurde einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst. Größere DNA-Mengen mit höherer Reinheit wurden mit dem PureLink® Maxiprep Kit (Invitrogen) aus 300 ml einer Übernacht-Kultur nach Herstellerangaben gewonnen.

### 2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Reaktionsansätze (50 µl) enthielten 50 – 200 ng Plasmid-DNA als Matrize und jeweils 1 µM Primerlösung sowie 1 µM Desoxynukleotidtriphosphate d(A, C, G, T)TPs, 10 µl 5x Puffer und 0,5 U der Taq-Polymerase (Analytik Jena). Das PCR-Temperaturprofil des Mastercyclers (Eppendorf) wurde mit einem einmaligen fünfminütigen Denaturierungsschritt gestartet, an den sich 30 wie folgt aufgebaute

Zyklen anschlossen: 1 min bei 95 °C für die Denaturierung der doppelsträngigen DNA, 1 min bei 55 °C – 60 °C , je nach Schmelztemperatur des Primers, für die Primeranlagerung (*annealing*) und 2 min bei 72 °C für die Transkription. Das PCR-Produkt wurde mittels des Rapid PCR Purification-Systems (Marligen) gereinigt. Durch das entsprechende Design der Primer konnte die gewonnene cDNA mittels spezifischer Restriktionsenzyme geschnitten und in den jeweiligen Vektor kloniert werden. Eine Auflistung der genutzten Primer findet sich im Anhang.

### 2.2.7 Fällung der DNA zur Überprüfung der cDNA-Konstrukte

Zur Überprüfung der verwendeten cDNA-Konstrukte wurden diese in getrockneter Form an Eurofins MWG (Ebersberg) gesendet. Dazu musste die DNA gefällt werden: 2 – 4 µg DNA wurden in 100 µl Wasser gelöst. Dazu wurden 10 µl Litiumchlorid und 80 µl Isopropanol gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000x g für 20 min und der Überstand wurde verworfen. Das DNA-Pellet wurde in 250 µl Ethanol aufgenommen, bevor nochmals für 20 min bei 13000x g zentrifugiert wurde. Wieder wurde der Überstand verworfen und die DNA bei RT getrocknet.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Proteinbestimmung

Um die Proteinmengen zu normalisieren wurden die Proteinkonzentrationen mit der Bicinchoninsäure-Methode mit dem Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) bestimmt. Nach Herstellerangaben wurde eine Kalibrierungskurve mit Rinderserumalbumin angelegt und die Proben beim Absorptionsmaximum des gebildeten Farbkomplexes bei 562 nm spektralphotometrisch bestimmt.

### 2.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach deren Molekulargewicht (MW) erfolgte mit Hilfe des Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra-Systems (Bio-Rad Laboratories) durch eine

diskontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese in einem Tris-HCl-Puffersystem. Die Proben wurden, wie an anderer Stelle erwähnt, im SDS-Ladepuffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 Vol. % SDS, 20 Vol. % Glycerol, 100 mM Dithiothreitol, 0,005 Vol. % Bromphenolblau) erhitzt. Es wurden Trenngele mit einem Acrylamid-Anteil von 7,5 (Rezeptornachweis) oder 10 Vol. % (alle anderen Proteine) verwendet. In die Taschen des Sammelgels (4 Vol. %) wurden zwischen 15 – 20 µl Proben sowie ein Molekulargewichts-Marker (Prestained PageRuler, Fermentas) gegeben. Daraufhin wurde eine Spannung von 130 V angelegt, bis die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

### 2.3.3 Western-Blot-Analyse und Immundetektion

Polyacrylamid-Gele mit den nach Größen aufgetrennten Proteinen wurden in Blot-Puffer (25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % Methanol, pH 8,3) für 10 min vorinkubiert. Eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) wurde in 100%igem Methanol aktiviert. Danach wurden im Trans-Blot<sup>®</sup> Semi-Dry (Bio-Rad) die Membran und das Proteingel zwischen Blotpuffer-getränkte Whatman-Papiere gelegt und es wurde für 1 h 200 mA angelegt. Es folgte das Blockieren der Membran durch 5 Gew. % Milchpulver in TBS-T (TBS mit 0,1 Vol. % Tween 20) für mindestens 45 min bei RT. Im Anschluss wurde nach kurzem Waschen mit TBS-T der Blot für 12 – 14 h mit dem Primär-Antikörper bei 4 °C inkubiert. Alle Primär-Antikörper wurden in 5 Gew. % Milchpulver in TBS-T, wie im Anhang angegeben, verdünnt. Nach dem Entfernen der Antikörper-Lösung wurde dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase- (HRP-) gekoppelten Sekundär-Antikörper erfolgte bei RT für 2 h. Die sekundären Antikörper wurden wie im Anhang angegeben in TBS-T mit 5 Gew. % Milchpulver verdünnt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Chemilumineszenz-Reaktion mittels SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate von Pierce nach Angaben des Herstellers induziert. Die Detektion erfolgte über chemilumineszenz-sensitive Röntgenfilme (T-Mat Plus DG Film, Kodak). Für die Entwicklung der Röntgenfilme wurde die automatische Entwicklermaschine Cawomat 2000 (Cawo) verwendet.

### 2.3.4 Dot-Blot-Analyse

Für die Dot-Blot-Analyse wurden PVDF-Membranen, Whatman-Papiere und das Minifold I Vakuumsfiltrationssystem (Schleicher & Schuell) verwendet. Die Whatman-Papiere und eine PVDF-Membran wurden vor dem Einbau in die Apparatur 30 min in Blot-Puffer inkubiert. Es wurde einmal mit Blot-Puffer gespült bevor 100 µl je Peptid-Verdünnung aufgetragen wurden. Danach wurde die Apparatur bei 30 min bei RT inkubiert, die Flüssigkeit abgesaugt und mit Blot-Puffer gespült bevor die PVDF-Membran ausgebaut wurde. Diese wurde 2 h in TBS-T mit 5 Gew. % Milchpulver blockiert. Die Immundetektion wurde wie für die Western-Blot-Analyse beschrieben durchgeführt.

### 2.3.5 Anreicherung der Rezeptorproteine mittels Weizenkeim-Lektin

Für eine Detektion des rsst<sub>2A</sub> mittels Western-Blot-Analyse mussten die Rezeptoren angereichert werden. Hierzu wurde eine zu ca. 80 % konfluent bewachsene Zellkulturschale (Durchmesser 6 cm), was etwa 3 Mio. Zellen entspricht, verwendet. Diese wurden direkt nach der jeweiligen Behandlung mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 800 µl RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 Vol. % Igepal, 0,5 Vol. % Natriumdesoxycholat, 0,1 Vol. % SDS) mit Protease-Inhibitoren (Complete-Mini<sup>®</sup> EDTA-free, Roche) und Phosphatase-Inhibitoren (PHOSStop<sup>®</sup>, Roche) und 10-minütiger Inkubation auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zellen mittels eines Zellsabers vom Boden der Zellkulturschalen gelöst und das Lysat in Reaktionsgefäße überführt. Daraufhin wurde das Lysat, um eine vollständige Lyse zu gewährleisten, bei 4 °C für 10 min geschüttelt bevor die Zelldebris mit einer Zentrifugation (20000x g, 4 °C, 30 min) pelletiert wurde. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde mit 40 µl Weizenkeim-Lektin-Agarose-Kügelchen, die alle N-Glykolisierten Proteine binden, versetzt und für 2 h auf einem Rotationsgerät bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit RIPA-Puffer. Dann wurden die Agarose-Kügelchen mit den gebundenen Proteinen mittels einer Insulin-Spritze von Restflüssigkeit getrennt, in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 25 min bei 65 °C erhitzt, bevor zur Western-Blot-Analyse übergegangen wurde.

### 2.3.6 Nachweis des Rezeptors aus dem Pankreas

Jeweils 2 Ratten, mit einem Gewicht von 150 – 200 g, wurden entweder Octreotid oder SOM230 (jeweils 50 µg/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Dreißig min nach der Injektion wurden die Ratten getötet und das Pankreas entnommen. Je 300 mg Gewebe wurden mit 500 µl eiskaltem RIPA-Puffer inklusive Protease-Inhibitoren (Complete-Mini® EDTA-free) und Phosphatase-Inhibitoren (PHOSStop®) versetzt und durch Anwendung des Ultraschallstabs für 10 s und darauf folgender Inkubation für 45 min bei 4 °C homogenisiert. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation (20000x g, 4 °C). Aus dem Überstand wurden, wie unter 2.3.5 beschrieben, die Rezeptorproteine angereichert, bevor sie auf das SDS-PAGE geladen und die Rezeptoren per Western-Blot-Analyse nachgewiesen wurden.

### 2.3.7 Immunhistochemie an Hypophysenschnitten

Gruppen zu 3 Ratten, mit einem Gewicht von 150 – 200 g, wurde entweder Octreotid oder SOM230 (jeweils 50 µg/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Neunzig min nach der Injektion wurden die Ratten getötet und die Hypophyse entnommen, die dann 72 h in 10%iger Formalin-Lösung bei RT inkubiert wurde. Mittels Jung-Histokinette (Leica) erfolgte die Entwässerung durch eine Ethanolreihe (50-, 70-, 80-, 90-, 96-%iger und absoluter Ethanol), die Überführung in Xylol und anschließend in Paraffin. Die ausgehärteten Gewebe-Paraffin-Blöcke wurden auf Kassetten geklebt, und mit einem Microtom 4 µM dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden per in Xylol für 1 h entparaffiniert. Zur Entfernung des Xylols wurden die Schnitte 1 h in absolutem Ethanol inkubiert. Die endogene Peroxidase wurde mit 0,15 Vol. % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol blockiert und es folgte die Rehydrierung der Schnitte durch eine absteigende Ethanolreihe bevor sie für 10 min in Aqua bidest. inkubiert wurden. Dann wurden die Schnitte 20 min bei 80 °C mit Citrat-Puffer (2 mM Citronensäure, 1 mM Natriumcitrat, pH 6,0) behandelt. Es folgten, durch Waschritte unterbrochen, folgende Inkubationen (Waschen sowie Inkubationen in PBS mit 1 % BSA): Über Nacht mit anti-sst2A bei 4 °C, 20 min mit 5 µl/ml biotinyliertem Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper (Vector) bei RT, 20 min mit 40 µl/ml Avidin-Peroxidase-Komplex (Vector) bei RT. Nach nochmaligem Waschen wurden die Schnitte durch

15-minütige Inkubation mit dem Peroxidase-Substrat 3-Amino-Ethyl-Carbazol (AEC, BioGenex) gefärbt. Die Reaktion wurde mit Aqua bidest. gestoppt. Dann wurden die Zellkerne durch 8-minütige Inkubation mit Meyers Hämatoxylin und Eintauchen in 0,01%-iger Ammoniaklösung gefärbt. Nach letztmaligem Waschen mit Aqua bidest. wurden die Präparate mit VectaMount (Vector) eingedeckt. Die Bilder wurden am Zeiss-Axio Imager A1 mit einer Jenoptik-Kamera angefertigt.

## 2.4 Zellkultur

### 2.4.1 Kultivierung und transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 (im Folgenden nur HEK genannt) stammt von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Die HEK-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), versetzt mit 10 Vol. % fötalem Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin, kultiviert. Die transiente Transfektion erfolgte mit Lipofectamin 2000<sup>®</sup> (Invitrogen) nach Herstellerangaben.

### 2.4.2 Stabile Transfektion von HEK-Zellen

Um Rezeptor-DNA in das Genom von HEK-Zellen zu integrieren, wurden diese in 10 cm Schalen ausgesät, mittels Lipofectamin 2000<sup>®</sup> mit der entsprechenden DNA transfiziert, nach 48 h mit 400 µg/ml Selektionsantibiotikum Genitcinsulfat (G-418) versetzt und ab da mehrmals über eine Woche der Zellrasen abgeklopft. Die verbleibenden Kolonien wurden weiterhin in Anwesenheit von 400 µg/ml G-418 kultiviert und die Expression des Rezeptors mittels Immuncytochemie verifiziert.

### 2.4.3 Kultivierung und Transfektion von GH<sub>3</sub>-Zellen

Die Ratten-Hypophysen-GH<sub>3</sub>-Zelllinie wurde von der DSMZ bereitgestellt. Sie wurden in HAM F10 Medium mit 15 Vol. % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml

Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin, kultiviert. Die transiente Transfektion erfolgte mit Lipofectamin 2000® (Invitrogen) nach Herstellerangaben.

### 2.4.4 Kultivierung von INS1-Zellen

Die Ratten Insulinom-Zelllinie INS1 wurde von Mathias Strowski (Charité, Berlin) bereitgestellt. INS1-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 5 Vol. % FKS, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Natrium-Pyruvat, 50 µM β-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin kultiviert.

### 2.4.5 Transfektion mit small interfering RNA (siRNA)

Die synthetisierten doppelsträngigen siRNA-Oligomere mit Poly-Thymin (dTdT)-Überhang am 3'-Ende wurden ebenso wie das siRNA-Transfektionsmittel HiPerFect® von Qiagen erworben. Direkt nach dem Ausbringen der stabil rsst<sub>2A</sub>-exprimierenden HEK-Zellen wurde die siRNA-Duplexe in einer Endkonzentration von 300 nM nach dem Hersteller-Protokoll transfiziert. Die Behandlung und die darauf folgende Weiterverarbeitung der Zellen erfolgte nach 72 h. Die Reduktion (*Knockdown*) der Proteinmengen wurde mittels Western-Blot-Analyse überprüft. Es wurden nur Experimente ausgewertet, in denen die Proteinmengen um  $\geq 80$  % verringert waren. Eine Auflistung der zum Einsatz gekommenen Zielsequenzen ist im Anhang unter 6.6 zu finden.

### 2.4.6 Zellbehandlung, -aufarbeitung und -lyse

Die Behandlung der Zellen mit Rezeptor-Agonisten bzw. -Antagonisten erfolgte in den zur Kultivierung verwendeten Medien ohne die Zugabe von Serum, da dieses die Haltbarkeit insbesondere von SS-14 herabsetzt. Vor der Lyse wurden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen bevor sie entweder für die Rezeptoranreicherung (s. 2.3.5) mit RIPA-Puffer oder für die direkte Western-Blot-Analyse mit 1-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer bei 95 °C versetzt und 5 min gekocht wurden, bevor sie auf das SDS-PAGE geladen wurden. Die Verarbeitung für den Internalisierungs-ELISA

(s. 2.4.7), die Immuncytochemie (s. 2.4.8) und die Lebendzellaufnahmen (s. 2.4.9) werden weiter unten erläutert.

### 2.4.7 Internalisierungs-ELISA

Um die relative Abnahme von membranständigem Rezeptor zu untersuchen, wurden 24-well-Schalen mit 0,2 mg/ml Poly-L-Lysin beschichtet und nach gründlichem Waschen und Trocknen mit stabil rsst<sub>2A</sub>-transfizierten HEK-Zellen bestückt. Wenn die Zellen eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht hatten, wurden sie 2 h bei 4 °C mit in Opti-MEM (Invitrogen) verdünntem anti-T7-Antikörper (1 µg/ml), der den N-terminalen T7-Tag des rsst<sub>2A</sub>-Fusionsproteins bindet, inkubiert. Danach wurden sie zweimal mit Opti-MEM gewaschen. Nun wurden die Zellen in DMEM, entweder ohne oder mit Liganden, bei 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Daraufhin 3-mal mit PBS gewaschen und die Zellen 40 min in 4 % Paraformaldehyd und 0.2 % Pikrinsäure in Phosphat-Puffer (pH 6,9) bei RT fixiert und dann mit HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper für 2 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Platten mit ABTS, einem HRP-Substrat, entwickelt und die optische Dichte bei 405 nm gemessen.

### 2.4.8 Immuncytochemie

Die anzufärbenden Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläser gegeben, bevor sie mind. 16 h bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C anwachsen konnten. Nach der jeweiligen Behandlung wurden sie 40 min in 4 % Paraformaldehyd und 0.2 % Pikrinsäure in Phosphat-Puffer (pH 6,9) bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen für 2 h in Antikörperlösung (0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit 0,1 Vol. % Triton X-100 und 3 Vol. % Ziegenserum) permeabilisiert und blockiert bevor der primäre Antikörper über Nacht inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen wurde mit Alexa-488-gekoppeltem Sekundärantikörper in Antikörperlösung für 2 h bei RT inkubiert, nach erneutem Waschen wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Fluoromount-G<sup>®</sup> (SouthernBiotech) auf den Objektträgern fixiert.



### 2.4.9 Lebendzellaufnahmen von $\beta$ -Arrestin-EGFP

HEK-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit Lipofectamin 2000<sup>®</sup> mit 2  $\mu$ g  $\beta$ -Arrestin-EGFP, 6  $\mu$ g rsst<sub>2A</sub> und 4  $\mu$ g GRK2 oder Leervektor auf 35-mm Glasboden-Zellkulturschalen (Mattek) ausgesät. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf einem beheizbaren Objektträgertisch des Leica TCS SP5 bei 37 °C gegeben. Aufnahmen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm sequentiell zu den angegebenen Zeitpunkten vor und nach der Agonist-Gabe erstellt.

### 2.4.10 Konfokale Laser-scanning-Mikroskopie

Immuncytochemisch Fluoreszenz-gefärbte Zellen wurden konfokal mit dem Leica TCS SP5 unter der Anwendung der Software Leica Application Suite angefertigt. Für alle zu einer Serie gehörenden Bilder blieben sämtliche Einstellungen unverändert.

## 2.5 Datenauswertung

Für die Quantifizierung der Intensität von Röntgenfilmsignalen wurde ImageJ 1.39s verwendet. Sämtliche statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4.0 durchgeführt. Die Bildbearbeitung wurde mit Adobe Photoshop CS2 durchgeführt und die Abbildungen mit Adobe InDesign CS2 erstellt.

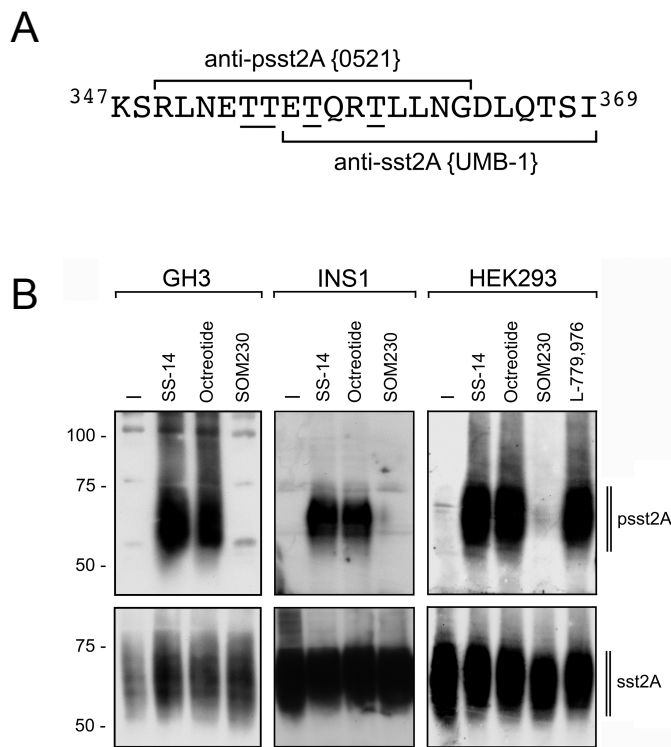
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Agonist-selektive Phosphorylierung des rsst<sub>2A</sub>-Rezeptors

Nachdem die C-terminale <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Sequenz als hauptsächliche Agonist-abhängige Phosphorylierungsstelle des rsst<sub>2A</sub> identifiziert worden war (Tulipano, Stumm et al. 2004), generierten wir phosphospezifische Antikörper gegen die Phospho-Threonine des Motivs. Abbildung 3 A zeigt das für die Immunisierungen genutzte Peptid zur Gewinnung des anti-psst2A Antikörpers ebenso wie das Epitop des phosphorylierungs-unabhängigen anti-sst2A Antikörper.

Mit dem rsst<sub>2A</sub>-Rezeptor transient transfizierte Zellen der Ratten-Hypophysen-Adenom-GH<sub>3</sub>-Zelllinie (Garcia und Myers 1994), zeigten eine massive Phosphorylierung nach fünfminütiger Stimulation mit 1 µM SS-14 oder 1 µM Octreotid (Abb. 3 B), während diese bei unbehandelten Zellen vollständig ausblieb. Überraschenderweise induzierte eine sättigende und in Bezug auf die Gα<sub>i</sub>-Aktivierung zu SS-14 und Octreotid äquimolare Konzentration von 10 µM SOM230 keine detektierbare Phosphorylierung des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs. Die gleichen Ergebnisse wurden nach fünfminütiger Behandlung mit den verschiedenen Agonisten in Ratten-Insulinom-(INS1-) Zellen, die den Rezeptor endogen exprimieren, erzielt (Abb. 3 B). Auch bei stabil mit rsst<sub>2A</sub> transfizierten HEK-Zellen untersuchten wir die <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Phosphorylierung. Diese Zellen sind abgesehen von ihrer leichten Handhabbarkeit auch ein geeignetes Modell, weil sie außer dem transfizierten rsst<sub>2A</sub> keine weiteren Somatostatin-Rezeptor-Subtypen exprimieren. Wiederum induzierten die Agonisten SS-14 (1 µM) und Octreotid (1 µM) eine starke Phosphorylierung des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs, während diese für die mit SOM230 (10 µM) stimulierten Zellen nicht nachweisbar war. Auch 1 µM L-779,976, ein nicht-peptidischer Agonist, führte zu einer genauso starken Phosphorylierung wie SS-14 und Octreotid.

Die Abhängigkeit der <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Phosphorylierung von der Dosis des Agonisten wurde von uns bereits gezeigt (Pöll et al., akzeptiert). SS-14 induziert schon bei einer Stimulationsdauer von 5 min und einer Konzentration von 1 nM eine deutlich detektierbare Phosphorylierung. Bei 1 µM SS-14 für die gleiche Dauer wird eine maximale Phosphorylierung erreicht.



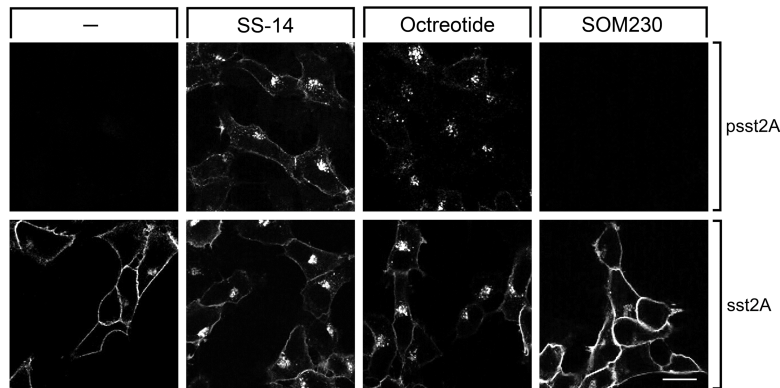
**Abb. 3: Der anti-psst2A detektiert die Agonist-selektive Phosphorylierung des rsst<sub>2A</sub>.** **(A)** Die C-terminalen AS des rsst<sub>2A</sub>. Die Peptide die für die Immunisierung von Kaninchen verwendet wurden sind für den anti-psst<sub>2A</sub> und den anti-sst<sub>2A</sub> gezeigt, wobei die unterstrichenen Threonine bei der Generation des anti-psst<sub>2A</sub> phosphoryliert waren. **(B)** *linke Spalte*, Ratten-Hypophysen GH<sub>3</sub>-Zellen wurden transient mit rsst<sub>2A</sub> transfiziert. Die Zellen wurden entweder mit keinem Agonisten oder für 5 min mit 1 µM SS-14, 1 µM Octreotid oder 10 µM SOM230 behandelt. *Mittlere Spalte*, INS1-Zellen, die den rsst<sub>2A</sub> endogen exprimieren, wurden entweder nicht oder für 5 min mit 1 µM SS-14, 1 µM Octreotid oder 10 µM SOM230 behandelt. *Rechte Spalte*, Stabil rsst<sub>2A</sub>-exprimierende HEK-Zellen wurden entweder nicht oder für 5 min mit 1 µM SS-14, 1 µM Octreotid, 10 µM SOM230 oder 1 µM L-779,976, behandelt. Die Menge des phosphorylierten rsst<sub>2A</sub> (*obere Reihe*) und die Gesamtmenge des rsst<sub>2A</sub> (*untere Reihe*) wurden mit den angegebenen Antikörpern mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Die gezeigten Experimente sind repräsentativ für zwei bis drei Experimente pro Western-Blot. Die durch den Molekularmasse-Marker ermittelten Größen sind auf der *linken Seite* in kDa angegeben.

Insgesamt lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass die vier Threonine des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs am C-terminalen Ende des rsst<sub>2A</sub> in hohem Maße Agonist-induziert und Agonist-selektiv phosphoryliert werden.

### 3.1.1 Agonist-induzierte Rezeptor-Internalisierung

Als nächstes sollte die Phosphorylierung des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs des rsst<sub>2A</sub> in Bezug auf die subzelluläre Lokalisation des Rezeptors untersucht werden. Zunächst wurden stabil rsst<sub>2A</sub>-transfizierte HEK-Zellen verwendet, bei denen, wie in Abbildung 4 ersichtlich, der Rezeptor ohne Stimulation an der Zellmembran lokalisiert war. Fünfminütige Stimulation mit 1 µM SS-14 oder auch 1 µM Octreotid führte zu einer starken Phosphorylierung, die mit sofortiger rsst<sub>2A</sub>-Internalisierung einherging, wie die anti-psst2A und anti-sst2A-Aufnahmen zeigten. Nach zweiminütiger Stimulation mit den Agonisten, die eine <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Phosphorylierung induzieren, waren die Rezeptoren mit dem anti-psst2A noch an der Membran (nicht gezeigt), nach fünfminütiger Stimulation in Vesikel-ähnlichen Strukturen im Cytosol

nachweisbar. Bei Behandlung mit der sättigenden Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  SOM230 konnte hingegen kein Unterschied zur unstimulierten Kontrolle festgestellt werden.

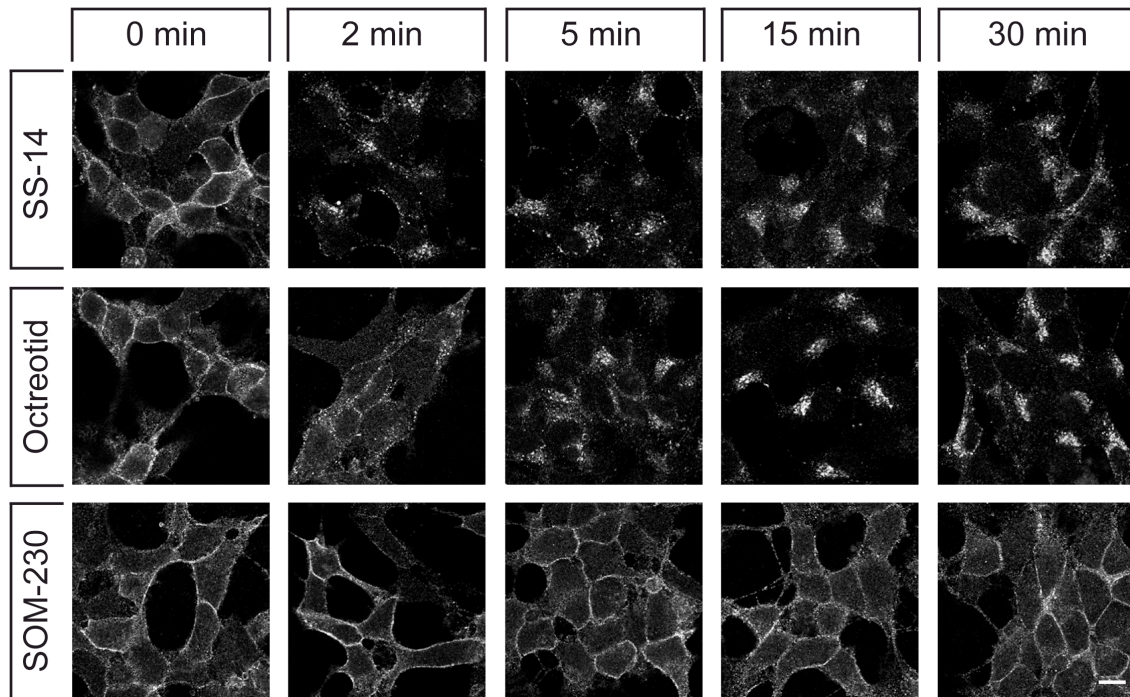


**Abb. 4: Auf die Agonist-induzierte Phosphorylierung folgt die  $rsst_{2A}$ -Internalisierung.** Stabil  $rsst_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen wurden entweder nicht oder für 5 min mit 1  $\mu\text{M}$  SS-14, 1  $\mu\text{M}$  Octreotid oder 10  $\mu\text{M}$  SOM230 behandelt. Daraufhin wurden die Zellen fixiert, immunocytochemisch mit anti-psst2A (*untere Reihe*) bzw. mit anti-sst2A fluoreszenzgefärbt und mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgenommen. Der Balken entspricht einer Größe von 20  $\mu\text{M}$ .

### 3.1.2 SOM230 induziert weder $rsst_{2A}$ -Phosphorylierung noch -Internalisierung

Der Nachweis der  $rsst_{2A}$ -Internalisierung, die auf die Phosphorylierung des cytosolischen  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Motivs folgt, sollte auch mit dem endogenen Rezeptor der INS1-Zellen erbracht werden. Leider konnte mit dem anti-psst2A keine für eine Analyse am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop ausreichende Signalstärke erreicht werden. Dennoch lässt sich, wie in Abbildung 5 gezeigt, mit dem phosphorylierungsunabhängigen anti-sst2A die Rezeptor-Internalisierung in INS1-Zellen zeitlich auflösen. Weiterhin sollten die Somatostatin-Analoga Octreotid und SOM230 getestet werden. Bei der Durchführung der Versuche war noch nicht bekannt, dass SOM230 am humanen  $sst_{2A}$  zu einer im Vergleich zu Octreotid und SS-14 verringerten Rezeptor-Internalisierung führt (Lesche, Lehmann et al. 2009). Noch deutlicher fiel der Unterschied am  $rsst_{2A}$  in den INS1-Zellen aus: Während die Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  SOM230 keine Veränderung der  $rsst_{2A}$ -Distribution verursachte, induzierten 1  $\mu\text{M}$  SS-14 und 1  $\mu\text{M}$  Octreotid eine Rezeptor-Umverteilung in das Cytosol, die nach 15 min ihr Maximum erreicht hatte. Wie oben erwähnt, sind die gewählten Konzentrationen in Bezug auf die Aktivierung des  $G\alpha_i$ -Proteins sättigend und äquimolar. Die in Abbildung 5 gezeigten Zeitverläufe stellten sich bei den stabil  $rsst_{2A}$ -transfizierten HEK-Zellen in gleicher Weise dar. Insofern konnte in HEK-Zellen ein Unterschied im Membrantransport von  $rsst_{2A}$  und  $hsst_{2A}$  nach

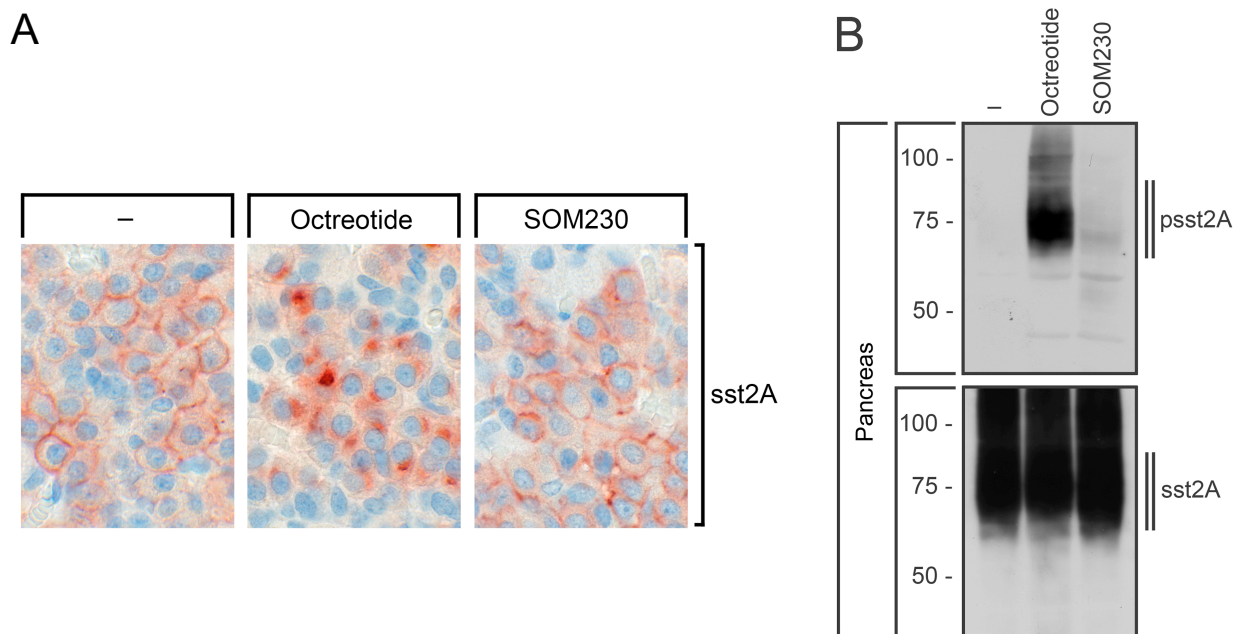
SOM230-Stimulation gezeigt werden: SOM230-Behandlung internalisiert den  $rsst_{2A}$  überhaupt nicht, während die Internalisierung des  $hsst_{2A}$  lediglich um 20 % reduziert ist.



**Abb. 5: Agonist-gesteuerte  $rsst_{2A}$ -Internalisierung in INS1-Zellen.** Ratten-Insulinom-(INS1-) Zellen, die  $rsst_{2A}$  endogen exprimieren, wurden 0, 2, 5, 15 oder 30 min mit 1  $\mu$ M SS-14 (*obere Reihe*), 1  $\mu$ M Octreotid (*mittlere Reihe*) oder 10  $\mu$ M SOM230 (*untere Reihe*) behandelt. Daraufhin wurden die Zellen fixiert, immunocytochemisch mit anti- $rsst_{2A}$  fluoreszenzgefärbt und mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet. Zu beachten ist, dass in dieser Abbildung keine Informationen über den Phosphorylierungs-Status des  $rsst_{2A}$  enthalten sind. Der Balken entspricht einer Größe von 20  $\mu$ M.

Nachdem diese überraschenden Befunde über SOM230 am  $rsst_{2A}$  in verschiedenen Zelllinien abgesichert worden waren, sollten sie auch mit *in vivo*-Daten untermauert werden. Hierzu wurden Ratten intraperitoneal Dosen von Octreotid und SOM230 injiziert, deren inhibitorische Wirkung auf die Ausschüttung von Hypophysen-Hormonen bekannt war (Bruns, Lewis et al. 2002). Die immunhistochemische Färbung von Hypophysenschnitten mit dem anti- $rsst_{2A}$  zeigte für unbehandelte Tiere einen membranständigen Rezeptor (Abb. 6 A). Bei Tieren, die 90 min nach der Octreotid-Gabe (50  $\mu$ g/kg Körpergewicht) getötet worden waren, war eine deutliche Umverteilung des Rezeptors in das Cytosol zu beobachten. 90 min nach der Injektion von SOM230 (50  $\mu$ g/kg Körpergewicht) konnte dagegen keine Veränderung der subzellulären Lokalisation des  $rsst_{2A}$  nachgewiesen werden.

Die *in vivo*-Phosphorylierung des  $rsst_{2A}$  sollte ebenfalls an Ratten untersucht werden. Hierfür wurden 30 min vor der Entnahme des Pankreas die gleichen Dosen von Octreotid und SOM230 subkutan injiziert (Abb. 6 B). Es zeigte sich das gleiche Bild wie bei den untersuchten Zelllinien: Die unbehandelte Kontrolle wies kein anti- $psst_{2A}$ -Signal auf (*oberer Blot*), SOM230 allenfalls eine schwache Bande, während Octreotid zu einem robusten anti- $psst_{2A}$ -Signal führte. Das Phosphorylierungs-unabhängige Signal des Gesamtrezeptors (*unterer Blot*) war für alle Bedingungen vergleichbar (Abb. 6 B).

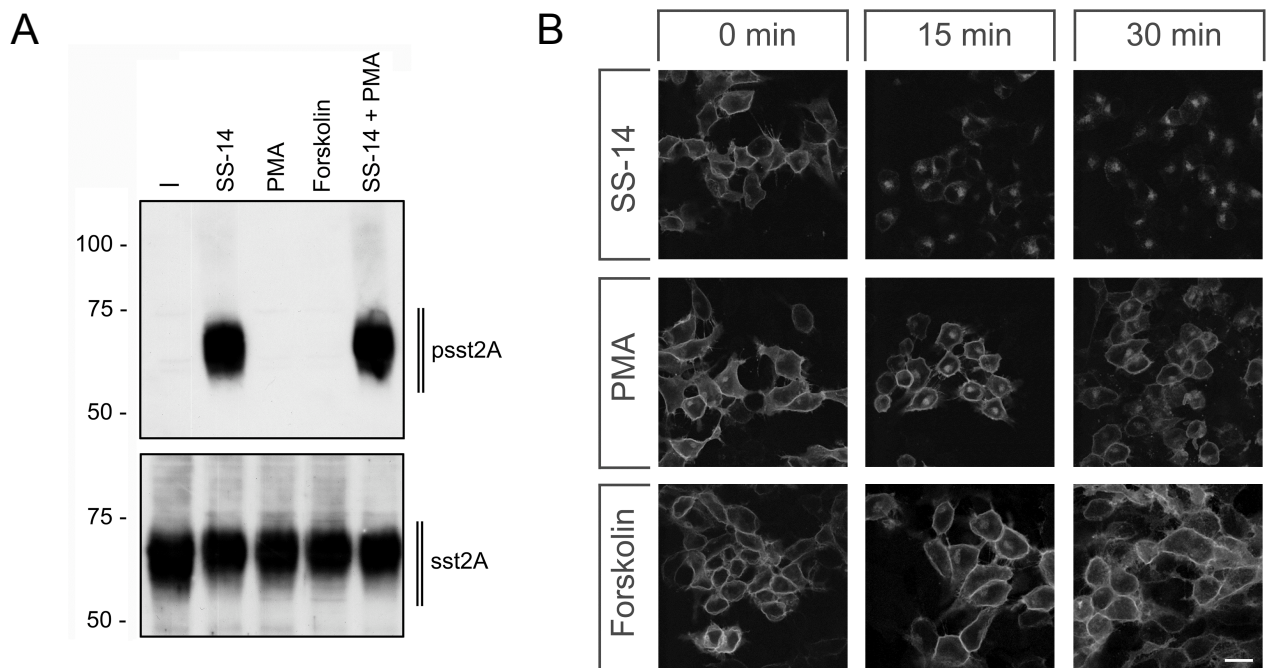


**Abb. 6: Agonist-selektive  $rsst_{2A}$ -Internalisierung und -Phosphorylierung *in vivo*.** (A) Ratten wurden entweder ohne Behandlung (-) oder 90 min nach der Injektion von Octreotid oder SOM230 (jeweils 50  $\mu$ g/kg Körpergewicht) getötet. Die Hypophyse wurde entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, um sie immunhistochemisch mit dem phosphorylierungsunabhängigen anti- $ssst_{2A}$  zu färben. (B) Jeweils 2 Ratten wurden entweder ohne Behandlung (-) oder 30 min nach der Injektion von Octreotid oder SOM230 (jeweils 50  $\mu$ g/kg Körpergewicht) getötet. Der Pankreas wurde entnommen und es wurde mittels Western-Blot-Analyse die Menge des phosphorylierten  $rsst_{2A}$  (*oberer Blot*) sowie des gesamten  $rsst_{2A}$  (*unterer Blot*) bestimmt. Die durch den Molekularmasse-Marker ermittelten Größen sind jeweils auf der *linken Seite* in kDa angegeben.



### 3.1.3 Die Phosphorylierung des $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Motivs wird nicht durch *Second-Messenger*-aktivierte Kinasen vermittelt

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können entweder homolog, durch spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRKs), oder heterolog, durch *Second-Messenger*-aktivierte Kinasen wie Proteinkinase A (PKA) oder Proteinkinase C (PKC), phosphoryliert werden. Aus diesem Grund behandelten wir stabil  $\text{rsst}_{2A}$ -exprimierende Zellen für 5 min entweder mit 100 nM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einem Aktivator der PKC, oder mit dem PKA-Aktivator Forskolin (10  $\mu\text{M}$ ), oder mit einer Kombination von PMA (100 nM) und SS-14 (1  $\mu\text{M}$ ) (Abb. 7). Eine mit dem anti-psst2A nachweisbare  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Phosphorylierung wurde weder durch PMA noch durch Forskolin hervorgerufen. Auch eine Kombination von PMA mit SS-14 führte keine Phosphorylierung herbei, die diejenige durch die Stimulation mit SS-14 alleine übertroffen hätte. Die vier Threonine des untersuchten Motivs scheinen kein Substrat für die PKA und die PKC zu sein.



**Abb. 7: Die Phosphorylierung des  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Motivs wird nicht durch *Second-Messenger*-aktivierte Kinasen vermittelt. (A)** Stabil  $\text{rsst}_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen wurden entweder nicht oder für 5 min mit 100 nM PMA, 10  $\mu\text{M}$  Forskolin oder 1  $\mu\text{M}$  SS-14 und 100 nM PMA behandelt. Die Menge der phosphorylierten  $\text{rsst}_{2A}$  (*obere Reihe*) und die Gesamtmenge des  $\text{rsst}_{2A}$  (*untere Reihe*) wurden mit den angegebenen Antikörpern mit Western-Blot Analyse nachgewiesen. Die gezeigten Experimente sind repräsentativ für zwei bis drei Experimente pro Western-Blot. Die durch den Molekularmasse-Marker ermittelten Größen sind auf der *linken Seite* in kDa angegeben. **(B)** Stabil  $\text{rsst}_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen wurden entweder nicht (0 min) oder für 15 min oder 30 min mit 100 nM PMA, 10  $\mu\text{M}$  Forskolin oder 1  $\mu\text{M}$  SS-14 behandelt. Daraufhin wurden die Zellen fixiert, immunocytochemisch mit anti-sst2A fluoreszenzgefärbt und mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet. Der Balken entspricht einer Größe von 30  $\mu\text{M}$ .

Nichtsdestotrotz zeigen publizierte Arbeiten, dass eine PMA-induzierte Aktivierung der PKC zu einer sst<sub>2A</sub>-Internalisierung führt (Hipkin, Wang et al. 2000; Pfeiffer, Koch et al. 2001). Auch an unseren stabil rsst<sub>2A</sub>-exprimierenden HEK-Zellen konnte dies bestätigt werden. In Abbildung 7 B ist vergleichend die rsst<sub>2A</sub>-Internalisierung nach 15 und 30 min Stimulation bzw. Aktivierung durch SS-14, PMA oder Forskolin dargestellt. Der Phosphorylierungs-unabhängige anti-sst<sub>2A</sub> zeigte die bekannte starke Umverteilung des rsst<sub>2A</sub> durch 1 µM SS-14. Bei 100 nM PMA fand sich eine schwächere Internalisierung mit einer verbleibenden Membranfärbung und bei 10 µM Forskolin konnte keine Internalisierung nachgewiesen werden (Abb. 7 B).

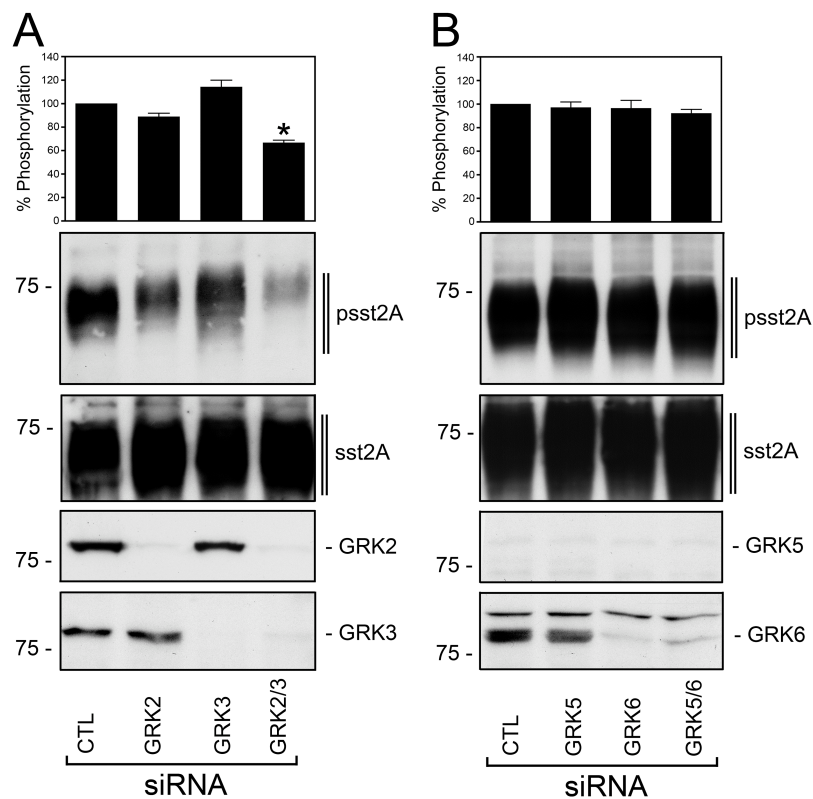
Eine neuere Publikation weist darauf hin, dass die Internalisierung des rsst<sub>2A</sub> durch die PKC hauptsächlich über die Phosphorylierung des Serin<sup>343</sup> vermittelt wird (Liu, Bee et al. 2009).

#### **3.1.4 GRK2 und GRK3 phosphorylieren das <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motiv Agonist-induziert**

Die Befunde, die mittels PMA- und Forskolin-Stimulation gewonnen worden waren, wiesen darauf hin, dass weder die PKA noch die PKC für die Agonist-induzierte <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Phosphorylierung eine Rolle spielen. Um den Beitrag einzelner GRKs zur rsst<sub>2A</sub>-Phosphorylierung zu untersuchen, nutzten wir spezifische *small-interfering-RNA*- (siRNA-) Sequenzen um *Knockdown*-Experimente durchzuführen. Es zeigte sich, dass die Herabsetzung der Expression von GRK2 oder GRK3 alleine zu keiner signifikanten Reduktion der durch 1 µM (5 min) SS-14 induzierten rsst<sub>2A</sub>-Phosphorylierung führte (Abb. 8). Die nahe Verwandtschaft von GRK2 und GRK3 könnte dazu geführt haben, dass eine der beiden GRKs das verringerte Vorkommen der anderen kompensieren konnte. Aus diesem Grund setzten wir siRNAs gegen beide untersuchte GRKs ein und konnten so einen starken *Knockdown* beider GRKs erreichen. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Kombination zu einer 40%igen Reduktion des anti-psst<sub>2A</sub>-Signals führte und deuten darauf hin, dass die verwandten Kinasen GRK2 und GRK3 als ein redundantes Phosphorylierungs-System für den rsst<sub>2A</sub> fungieren (Abb. 8 A). Für die ebenfalls miteinander eng verwandten GRK5 und GRK6 verwendeten wir den gleichen Ansatz (Abb. 8 B). Die Expressions-



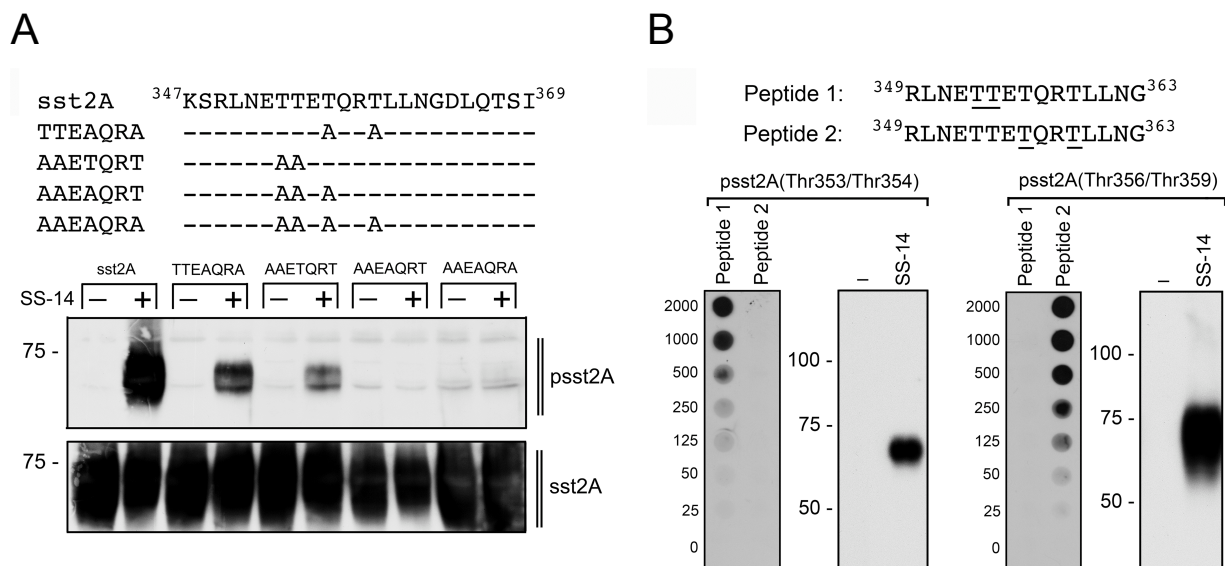
Inhibition dieser beiden Kinasen führte zu keiner Verringerung der rsst<sub>2A</sub>-<sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Phosphorylierung. Allerdings konnte die GRK5 in unseren stabil rsst<sub>2A</sub>-transfizierten HEK-Zellen mittels Western-Blot-Analyse nicht nachgewiesen werden. Die anderen GRKs können aufgrund Ihres Expressionsmusters keine Bedeutung für die Regulation des rsst<sub>2A</sub> haben, da ihr Expressionsmuster nicht mit dem des Rezeptors übereinstimmt: GRK1/Rhodopsin-Kinase und GRK7/Iodopsin-Kinase sind in der Retina exprimiert und regulieren die Lichtrezeptoren, die Opsine. Die GRK4-Expression beschränkt sich fast ausschließlich auf die Hoden (Premont und Gainetdinov 2007).



**Abb. 8: GRK2 und GRK3 vermitteln die Agonist-induzierte rsst<sub>2A</sub>-Phosphorylierung.** Stabil rsst<sub>2A</sub>-exprimierende HEK-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs wie unter Material und Methoden beschrieben, transfiziert. Nach 72 h wurden sie für 5 min mit 1 µM SS-14 stimuliert. **(A)** Transfektion mit siRNA, die gegen GRK2, GRK3 oder GRK2 und GRK3 gerichtet ist, oder mit einer Kontroll-Sequenz, die keine mRNA binden kann (CTL). **(B)** Transfektion mit siRNAs, die gegen GRK5, GRK6 oder GRK5 und GRK6 gerichtet ist, oder mit einer Kontroll-Sequenz, die keine mRNA binden kann (CTL). **(A + B)** Für die Western-Blot-Analyse sowohl des gesamten und des phosphorylierten Rezeptors, als auch der GRKs wurden die gleichen Proteinmengen eingesetzt. Das anti-psst2A-Signal wurde wie in Material und Methoden beschrieben quantifiziert und das Signal der jeweiligen Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte ± der Standardabweichung von mindestens 4 unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung. Die Ergebnisse wurden mit dem Zweistichproben t-Test nach Student (\*, p<0.05) analysiert. Die Koexpression von GRK2 und GRK3 führten zu einer signifikanten Verringerung des anti-psst2A-Signals. Die durch den Molekularmasse-Marker ermittelten Größen sind jeweils auf der *linken Seite* in kDa angegeben.

### 3.1.5 Das gesamte <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motiv wird phosphoryliert

Um das Epitop des anti-psst2A-Antikörpers genauer untersuchen zu können, wurde mittels zielgerichteter Mutagenese eine unterschiedliche Anzahl von Threoninresten zu Alaninen ausgetauscht. Abbildung 9 A zeigt die vorgenommenen Mutationen im C-Terminus. Die Western-Blot-Analyse der generierten Mutanten nach fünfminütiger Stimulation mit 1 µM SS-14 zeigte Unterschiede im anti-psst2A-Signal. Wie erwartet blieb das Phosphorylierungs-Signal für die Mutante ohne die vier Threonine (<sup>353</sup>AAEAQRA<sup>359</sup>) vollständig wie auch bei der unstimulierten Kontrolle aus.



**Abb. 9: Das <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motiv wird vollständig phosphoryliert.** (A) Mutationsstudien zur detaillierten Untersuchung des anti-psst2A-Epitops. *Oben*, Die carboxyterminale Aminosäure-Sequenz des rsst<sub>2A</sub> und der verschiedenen durch zielgerichtete Mutagenese gewonnenen Mutanten, wobei – keine Veränderung zum Wildtyp anzeigt. *Unten*, HEK-Zellen wurden mit Wildtyp-rsst<sub>2A</sub>, der <sup>353</sup>TTEAQR<sup>359</sup>-, der <sup>353</sup>AAETQRT<sup>359</sup>-, der <sup>353</sup>AAEAQR<sup>359</sup> oder der <sup>353</sup>AAEAQR<sup>359</sup>-Mutante stabil transfiziert und dann unbehandelt gelassen oder mit 1 µM SS-14 für 5 min stimuliert. Die Proteinmengen der Proben wurden daraufhin, wie in Material und Methoden beschrieben, angeglichen und die Menge der Gesamt-Rezeptoren sowie der phosphorylierten Rezeptoren wurde mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Das polyklonale anti-psst2A-Antiserum detektiert sowohl die Phosphorylierung von Thr<sup>353</sup> und Thr<sup>354</sup> der <sup>353</sup>TTEAQR<sup>359</sup>-Mutante als auch diejenige von Thr<sup>356</sup> und Thr<sup>359</sup> der <sup>353</sup>TTEAQR<sup>359</sup>-Mutante. (B) Charakterisierung der affinitätsgereinigten anti-psst2A(Thr353/Thr354) und anti-psst2A(Thr356/Thr359). *Oben*, Die Aminosäure-Sequenzen der für die Immunoaffinitäts-Aufreinigung des anti-psst2A genutzten Peptide. Die *unterstrichenen* Phosphorylierungsstellen von Peptid 1 und Peptid 2 waren phosphoryliert. *Unten*, Die Charakterisierung von anti-psst2A(Thr353/Thr354) und anti-psst2A(Thr356/Thr359) mittels Dot-Blot-Analyse (jeweils die *linke Spalte*) sowie auch Western-Blot-Analyse (jeweils die *rechte Spalte*). Für die Dot-Blot-Analyse wurden Verdünnungsreihen (0-2000 ng) des jeweiligen Peptids geblottet. Die verwendeten Proteinmengen sind *links* neben den Dot-Blot-Abbildungen angegeben. Für die Western-Blot-Analyse wurden stabil-rsst<sub>2A</sub>-transfizierte HEK-Zellen 5 min mit 1 µM SS-14 behandelt oder unbehandelt verwendet. Die gleichen Proben wurden dann auf die Menge des an den entsprechenden Stellen phosphorylierten rsst<sub>2A</sub> mit psst2A(Thr353/Thr354) und anti-psst2A(Thr356/Thr359) untersucht. Die durch den Molekularmasse-Marker ermittelten Größen sind jeweils auf der *linken Seite* in kDa angegeben.

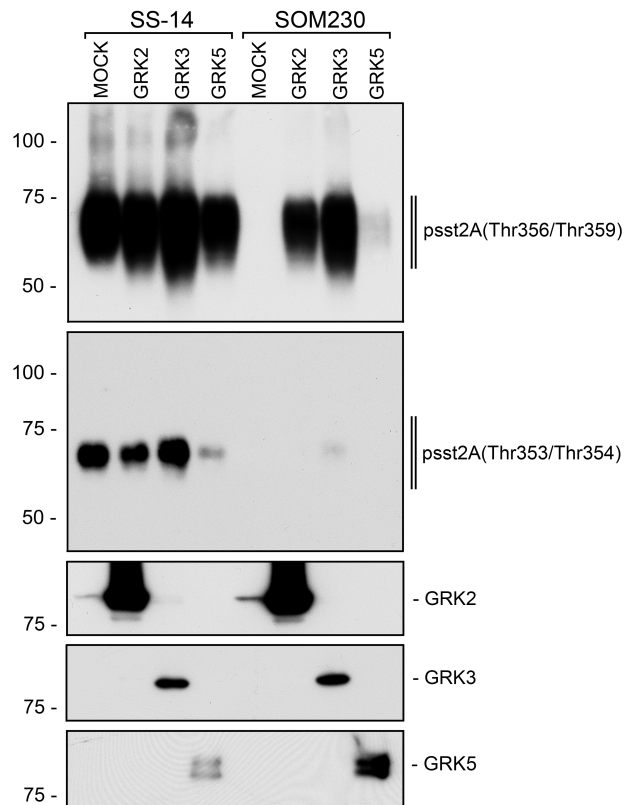
Das gleiche galt für die Mutante mit einem verbliebenen Threonin (<sup>353</sup>AAEAQRT<sup>359</sup>). Waren jedoch entweder die vorderen (<sup>353</sup>TTEAQRA<sup>359</sup>) oder die hinteren (<sup>353</sup>AAETQRT<sup>359</sup>) Threonine vorhanden, konnte eine abgeschwächte Phosphorylierung nachgewiesen werden. Diese deutet darauf hin, dass alle vier Threonine des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs phosphoryliert werden (Abb. 9 A).

Mit dem Ziel in Zukunft die Agonist-induzierte Phosphorylierung des rsst<sub>2A</sub> besser auflösen zu können, wurden die in Abbildung 9 B gezeigten Phospho-Peptide genutzt um eine selektive Immunaффinitäts-Aufreinigung des anti-psst2A-Antiserums zu erreichen. Die erfolgreiche Generation von affinitätsgereinigten Antikörpern, die entweder selektiv an die proximalen beiden phosphorylierten Threonine – anti-psst2A(Thr353/Thr354) – oder die distalen beiden phosphorylierten Threonine – anti-psst2A(Thr356/Thr359) – binden, konnte sowohl mittels Dot-Blot- als auch mit Western-Blot-Analyse bestätigt werden (Abb. 9 B).

### **3.1.6 Agonist-selektive Muster der rsst<sub>2A</sub>-Phosphorylierung**

Nachdem eine Rolle von GRK2 und GRK3 bei der Phosphorylierung des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs durch siRNA-Versuche belegt war, sollte anhand der Überexpression dieser Kinasen und der hinzugewonnenen Möglichkeit der genaueren Betrachtung der Phosphorylierung ein Vergleich der Agonisten SS-14 und SOM230 durchgeführt werden, da hier die Ursachen der Unterschiede im induzierten rsst<sub>2A</sub>-Internalisierungsverhalten vermutet wurden. Neben der GRK2 und GRK3 sollte die GRK5 überexprimiert werden, auch weil deren Rolle in den siRNA-Experimenten nicht eindeutig geklärt werden konnte, da in den verwendeten HEK-Zellen keine GRK5 nachgewiesen werden konnte. Ein GRK6-Konstrukt stand nicht zur Verfügung. Wie erwartet, führte die Überexpression von GRK2 und GRK3 nach der Stimulation mit 1 µM SS-14 (5 min) zu einer Hyperphosphorylierung – zumindest der beiden Threonine Thr<sup>356</sup> und Thr<sup>359</sup> (Abb. 10). Die Überexpression von GRK5 in Kombination mit SS-14-Stimulation führte hingegen zu keiner Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (MOCK). Die fünfminütige Stimulation mit 10 µM SOM230 führte bei den Kontroll- und den GRK5-transfizierten Zellen zu keiner nachweisbaren Phosphorylierung des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs. Mit der Überexpression von GRK2 und

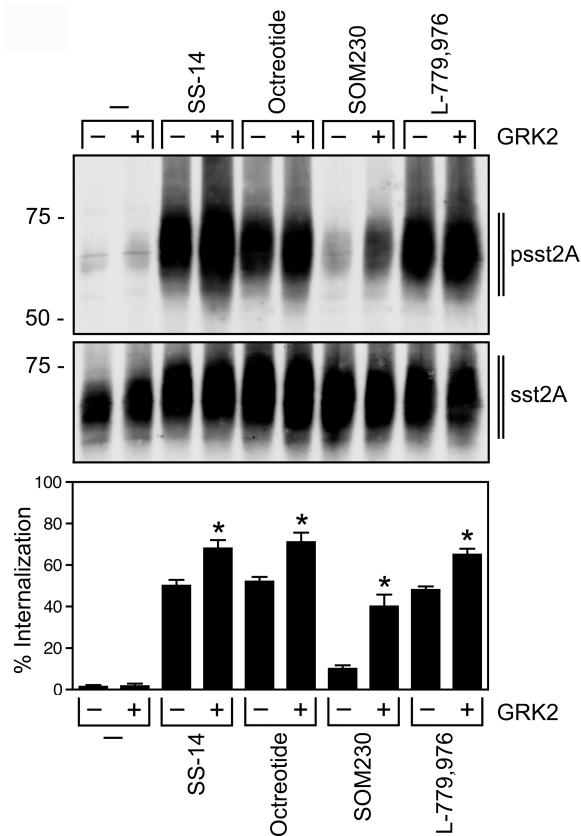
GRK3 zeigte sich ein deutliches Phosphorylierungs-Signal für die hinteren beiden Threonine des Motivs. Die ersten beiden, Thr<sup>353</sup> und Thr<sup>354</sup>, hingegen, wurden auch unter diesen Bedingungen nicht durch SOM230-Behandlung phosphoryliert. Dies deutet auf ein Agonist-selektives Muster der <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Phosphorylierung hin.



**Abb. 10: Agonist-selektive Muster der rsst<sub>2A</sub>-Phosphorylierung.** Stabil rsst<sub>2A</sub>-exprimierende HEK-Zellen wurden mit Leervektor (MOCK), GRK2, GRK3 oder GRK5 transient transfiziert. Nach 48 h wurden sie 5 min mit 1 µM SS-14 oder 10 µM SOM230 stimuliert. Die Menge der an Thr<sup>353</sup> und Thr<sup>354</sup> bzw. an Thr<sup>356</sup> und Thr<sup>359</sup> phosphorylierten Rezeptoren wurde mit anti-psst2A(Thr356/Thr359) (*oben*) bzw. anti-psst2A(Thr353/Thr354) (*unten*) bestimmt. Die Überexpression von GRK2, GRK3 und GRK5 wurden mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Die durch den Molekularmasse-Marker ermittelten Größen sind jeweils auf der *linken Seite* in kDa angegeben.

### 3.1.7 Die Agonist-induzierte Phosphorylierung reguliert die Internalisierung des rsst<sub>2A</sub>

Nun sollte der Einfluss der unterschiedlichen Agonist-induzierten Phosphorylierung des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs durch verschiedene Agonisten mit und ohne Überexpression der GRK2 auf die Internalisierungsrate des rsst<sub>2A</sub> untersucht werden. Der obere Western-Blot in Abbildung 11 zeigt die Signalstärke des anti-psst2A, die nach fünfminütiger Stimulation mit SS-14 (1 µM), Octreotid (1 µM), SOM230 (10 µM) oder L-779,976 (1 µM) mit Überexpression eines Leervektors oder der GRK2 erzeugt wurde. Dabei zeigte sich, dass die drei Agonisten SS-14, Octreotid und L-779,976 ein starkes Signal hervorriefen, welches durch eine erhöhte Expression der GRK2 noch verstärkt werden konnte. Bei SOM230 zeigte sich nur ein geringes anti-psst2A-Signal, welches aber durch die Überexpression von GRK2 erhöht werden konnte.

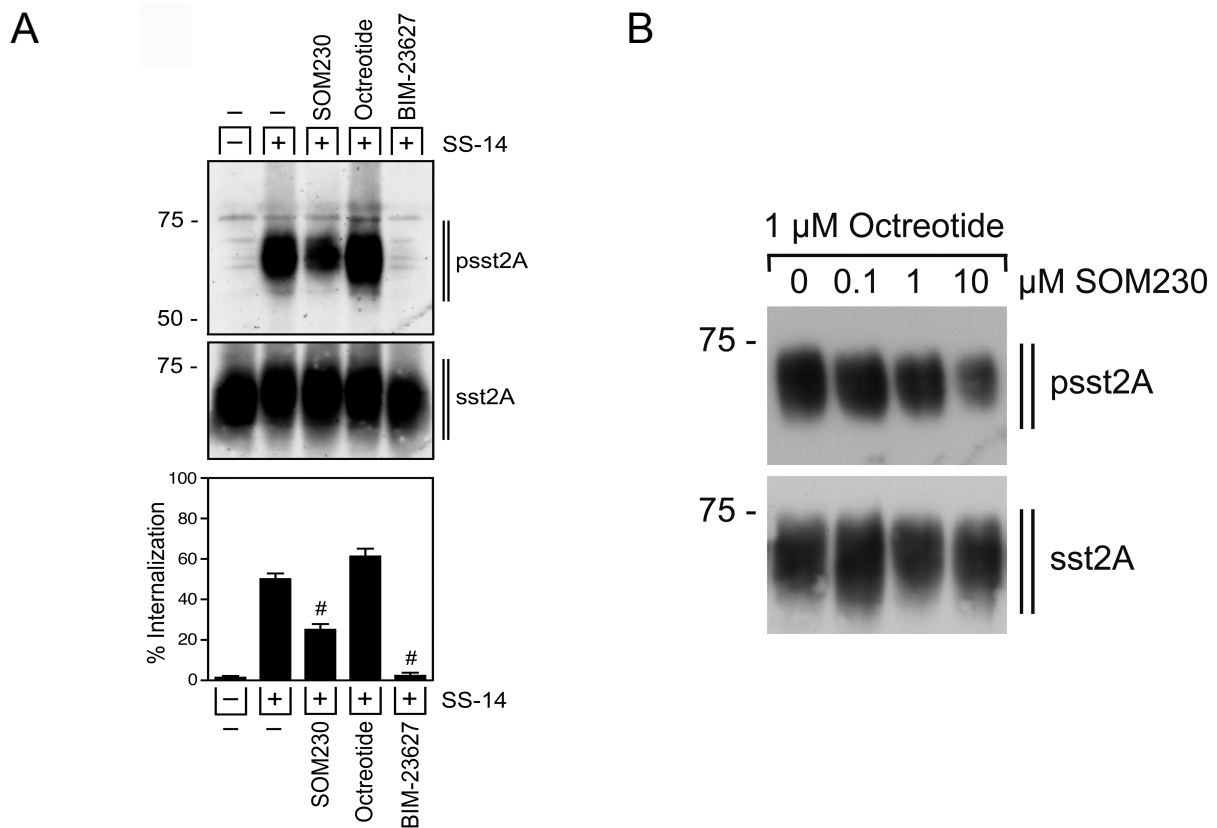


**Abb. 11: Agonist-selektive rsst<sub>2A</sub>-Phosphorylierung und -Internalisierung.** Stabil rsst<sub>2A</sub>-exprimierende HEK-Zellen wurden entweder mit Leervektor oder GRK2 transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen entweder nicht oder für 5 min mit 1  $\mu$ M SS-14, 1  $\mu$ M Octreotid, 10  $\mu$ M SOM230 oder 1  $\mu$ M L-779,976 behandelt. Die Menge des phosphorylierten rsst<sub>2A</sub> (*oberes Bild*) und die Gesamtmenge des rsst<sub>2A</sub> (*mittleres Bild*) wurden mit den angegebenen Antikörpern mit Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Die gezeigten Experimente sind repräsentativ für zwei Experimente. Die durch den Molekularmasse-Marker ermittelten Größen sind auf der *linken Seite* in kDa angegeben. Für die Internalisierungs-ELISA-Experimente wurden ebenfalls stabil rsst<sub>2A</sub>-exprimierende HEK-Zellen entweder mit Leervektor oder GRK2 transfiziert (*Balkendiagramm*). Nach 48 h wurden die Zellen für 20 min mit 1  $\mu$ M SS-14, 1  $\mu$ M Octreotid, 10  $\mu$ M SOM230 oder 1  $\mu$ M L-779,976 behandelt, die rsst<sub>2A</sub>-Internalisierung wurde als Rückgang von oberflächenständigen Rezeptoren per ELISA ermittelt und in Prozent quantifiziert, wobei die unstimulierte Kontrolle 100 % entsprach. Die Internalisierungs-ELISA-Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt und wurden aus vier unabhängigen Experimenten mit Vierfachbestimmung gewonnen. Die Ergebnisse wurden durch den Zweistichproben t-Test nach Student analysiert (\*,  $p < 0.05$ , signifikanter Anstieg im Vergleich zu unstimulierten Zellen).

Um diese Befunde mit der induzierten rsst<sub>2A</sub>-Internalisierung vergleichen zu können, wurde unter gleichen Bedingungen der unter Material und Methoden beschriebene Internalisierungs-ELISA durchgeführt. Nur die Stimulationsdauer wurde auf 20 min erhöht, um das Maximum der Agonist-induzierten Internalisierung auswerten zu können (Abb. 11, *unten*). Dabei zeigte sich eine Internalisierungseffizienz, welche die Phosphorylierungs-Stärke des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs nachbildete. Bei den Agonisten, mit deren Behandlung ein deutliches anti-psst2A-Signal erzeugt werden konnte (SS-14, Octreotid und L-779,976), wurde etwa die Hälfte aller membranständigen rsst<sub>2A</sub> internalisiert. Diese Rate konnte durch die Überexpression von GRK2, vergleichbar dem anti-psst2A-Signal, signifikant um 15 – 20 % gesteigert werden. Während die unstimulierte Kontrolle (–) keine messbare Internalisierung erzeugte, wurde durch SOM230 eine mäßige (9 %) induziert, welche sich durch die Überexpression von GRK2 auf knapp 50 % steigern ließ. Auch dieser Befund spiegelt die deutliche Zunahme von SOM230-induzierter rsst<sub>2A</sub>-Phosphorylierung bei GRK2-Überexpression wider.

### 3.1.8 SOM230 zeigt partialagonistische Eigenschaften

SOM230 hatte nicht die Eigenschaften eines vollen Agonisten gezeigt. Nun wurden stabil  $rsst_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen für 5 min mit 1  $\mu$ M Octreotid, 10  $\mu$ M SOM230 oder mit 10  $\mu$ M des Antagonisten BIM-23627 behandelt, bevor sie für weitere 5 min mit 1  $\mu$ M SS-14 stimuliert wurden (Abb. 12, *oben*). Zum Vergleich dienten auch vollkommen unbehandelte sowie nur 5 min mit SS-14 behandelte Zellen. Für den Internalisierungs-ELISA wurde nur die zweite Behandlung in Anwesenheit der anderen Substanzen auf 20 min ausgedehnt (Abb. 12, *Balkendiagramm*).



**Abb. 12: Partialagonistische Eigenschaften von SOM230. (A)** *Western-Blots*, stabil  $rsst_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 1  $\mu$ M Octreotid, 10  $\mu$ M SOM230 oder 10  $\mu$ M BIM-23627 behandelt, bevor für 5 min 1  $\mu$ M SS-14 hinzugegeben wurde. Die Menge des phosphorylierten  $rsst_{2A}$  (anti-psst2A) und die Gesamtmenge des  $rsst_{2A}$  (anti-sst2A) wurden mit den angegebenen Antikörpern mit Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Die durch den Molekularmasse-Marker ermittelten Größen sind auf der *linken Seite* in kDa angegeben. *Balkendiagramm*, stabil  $rsst_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 1  $\mu$ M Octreotid, 10  $\mu$ M SOM230 oder 10  $\mu$ M BIM-23627 behandelt, bevor für 20 min zusätzlich mit 1  $\mu$ M SS-14 stimuliert wurde. Die  $rsst_{2A}$ -Internalisierung wurde als Rückgang von oberflächenständigen Rezeptoren mittels Internalisierungs-ELISA ermittelt und in Prozent quantifiziert, wobei die unstimulierte Kontrolle 100 % entsprach. Die ELISA-Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt und wurden aus vier unabhängigen Experimenten mit Vierfachbestimmung gewonnen. Die Ergebnisse wurden durch den Zweistichproben t-Test nach Student analysiert (<sup>#</sup>,  $p < 0.05$ , signifikante Verringerung im Vergleich mit SS-14 stimulierten Zellen). **(B)** Stabil  $rsst_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 0,1, 1 oder 10  $\mu$ M SOM230 behandelt. Nach 3 min wurde 1  $\mu$ M Octreotid für 5 min zugegeben. Die Menge des phosphorylierten  $rsst_{2A}$  (anti-psst2A) und die Gesamtmenge des  $rsst_{2A}$  (anti-sst2A) wurden mit den angegebenen Antikörpern mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen.

In Anwesenheit von SS-14 wirkte SOM230 als Partialagonist. Es inhibierte die SS-14-induzierte Phosphorylierung ebenso wie die Internalisierung des  $rsst_{2A}$ . Der Antagonist BIM-23627 blockte die Agonist-induzierte Phosphorylierung und Internalisierung des  $rsst_{2A}$  komplett, so dass keine Unterschiede zur unstimulierten Kontrolle (–) zu erkennen waren.

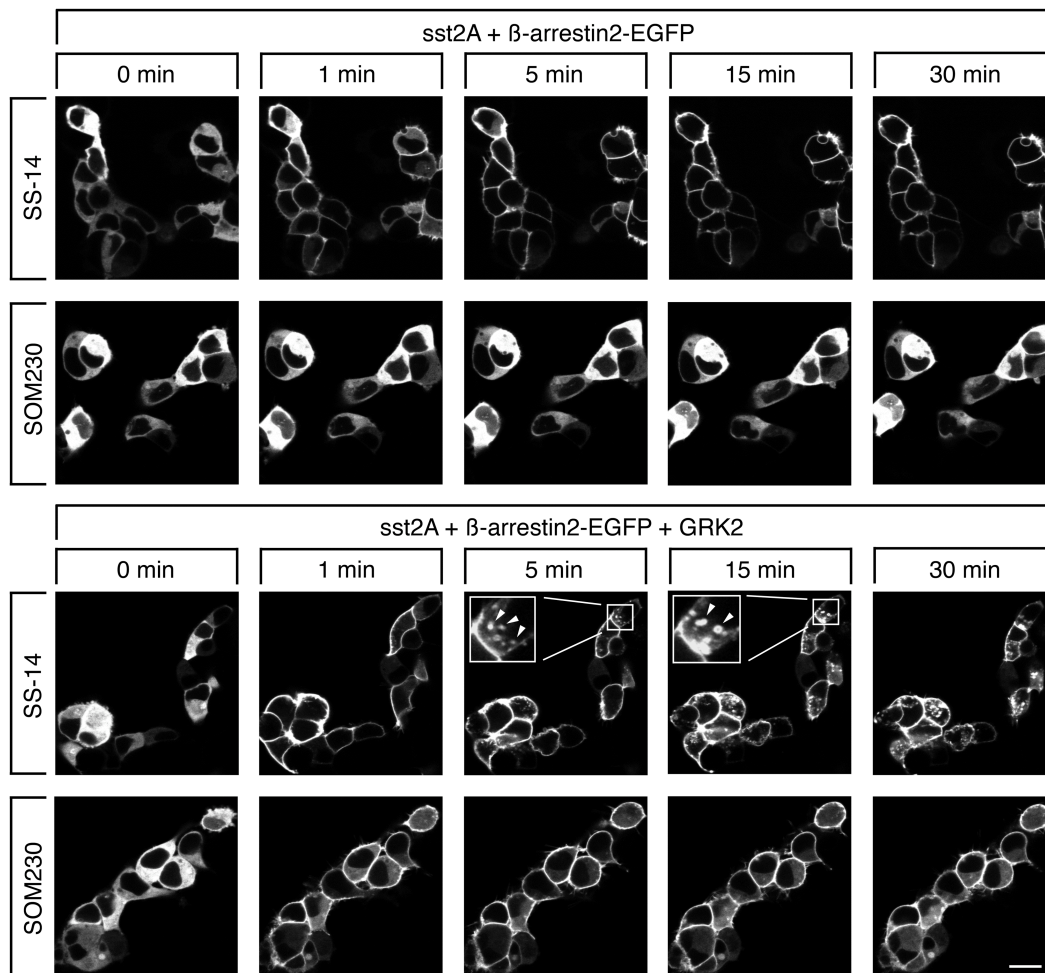
Da klinisch auch eine Koadministration von Octreotid und SOM230 in Betracht kommen könnten, sollte der partialantagonistische Effekt von SOM230 zusammen mit Octreotid Dosis-abhängig überprüft werden. Hierzu wurden stabil  $rsst_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen (0, 0,1, 1, 10  $\mu$ M) von SOM230 3 min vorbehandelt, bevor für 5 min 1  $\mu$ M Octreotid hinzugegeben wurde (Abb. 12 B). Es zeigte sich, dass mit ansteigender Konzentration von SOM230, die Octreotid-vermittelte  $rsst_{2A}$ -Phosphorylierung vermindert wurde. So bestätigte sich auch hier die partialantagonistische Eigenschaft von SOM230 am  $rsst_{2A}$ , was auch klinisch von Bedeutung sein könnte.

### **3.1.9 SS-14 und SOM230 induzieren unterschiedliche Muster der $\beta$ -Arrestin-Translokation**

Eine  $rsst_{2A}$ -Trunktationsmutante, der das gesamte  $^{353}TTETQRT^{359}$ -Motiv fehlt ( $rsst_{2A}$ -359X), sowie auch eine Mutante, bei der Thr<sup>353</sup>, Thr<sup>354</sup> und Thr<sup>356</sup> zu Alaninen mutiert sind, induzieren nach SS-14-Stimulation keine  $\beta$ -Arrestin-Translokation vom Cytosol an die Zellmembran, wie dies der  $rsst_{2A}$ -Wildtyp vermag (Tulipano, Stumm et al. 2004). Die unterschiedlichen  $^{353}TTETQRT^{359}$ -Phosphorylierungsmuster, die durch SS-14 und Octreotid im Vergleich zu SOM230 hervorgerufen wurden, und deren Folgen für die  $rsst_{2A}$ -Internalisierung legten auch Unterschiede für die Agonist-induzierte  $\beta$ -Arrestin-Translokation der beiden Substanzen nahe. Deswegen wurde ein Fusionsprotein aus funktionellem  $\beta$ -Arrestin-2 und verstärktem grün-fluoreszierendem Protein (EGFP) mit  $rsst_{2A}$  in HEK-Zellen kotransfiziert und für 48 h exprimiert (Abb. 13, *oben*). Um die Bewegungen des  $\beta$ -Arrestin-2-EGFP visualisieren zu können, wurden lebende Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Stimulation mit dem konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen (Abb. 13). Ohne die Zugabe eines Agonisten ist  $\beta$ -Arrestin-2-EGFP gleichmäßig im Cytoplasma verteilt.



Die Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  SS-14 führte zu einer schnellen Umverteilung ( $< 5$  min) des  $\beta$ -Arrestin-2-EGFP vom Cytosol an die Zellmembran. Diese Umverteilung konnte durch eine ebenfalls sättigende Konzentration von SOM230 (10  $\mu\text{M}$ ) nicht erreicht werden.



**Abb. 13: SS-14 und SOM230 induzieren unterschiedliche Muster der  $\beta$ -Arrestin-Translokation.** HEK-Zellen wurden transient mit 2  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Arrestin-2-EGFP, 6  $\mu\text{g}$   $\text{rsst}_{2A}$  transfiziert (*oben*). Bei dem *unten* gezeigten Experiment wurden noch 4  $\mu\text{g}$  GRK2 kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die subzelluläre Verteilung des  $\beta$ -Arrestin-2-EGFPs sequentiell an lebenden Zellen bevor (0 min) und nach (1, 5, 15 und 30 min) der Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  SS-14 oder 10  $\mu\text{M}$  SOM230 aufgenommen. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen von einem von vier unabhängigen Experimenten, die doppelt durchgeführt wurden. Der Maßstab entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Da eine GRK2-Überexpression die  $\text{rsst}_{2A}$ -Phosphorylierung nach Behandlung mit SOM230 oder SS-14 verstärkte, wurde der gleiche Versuch mit einer Kotransfektion von GRK2 durchgeführt (Abb. 13, *unten*). Unter dieser Bedingung wurde auch durch die Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  SOM230 eine Redistribution von  $\beta$ -Arrestin-2-EGFP



erreicht, die der vergleichbar war, die bei SS-14 Stimulation mit dem endogenen Level von GRK2 induziert wurde. SS-14-Stimulation kombiniert mit der Überexpression von GRK2 führte zu einer noch stärkeren Bindung von  $\beta$ -Arrestin-2-EGFP an den  $rsst_{2A}$ , was zu einer gemeinsamen Internalisierung führte, wie durch die Internalisierung von  $\beta$ -Arrestin-2-EGFP in Vesikel-ähnliche Strukturen im Cytosol nahegelegt wurde (Abb. 13, *Vergrößerungen*). Dieser Effekt konnte mit SOM230 unter keiner Bedingung erreicht werden.

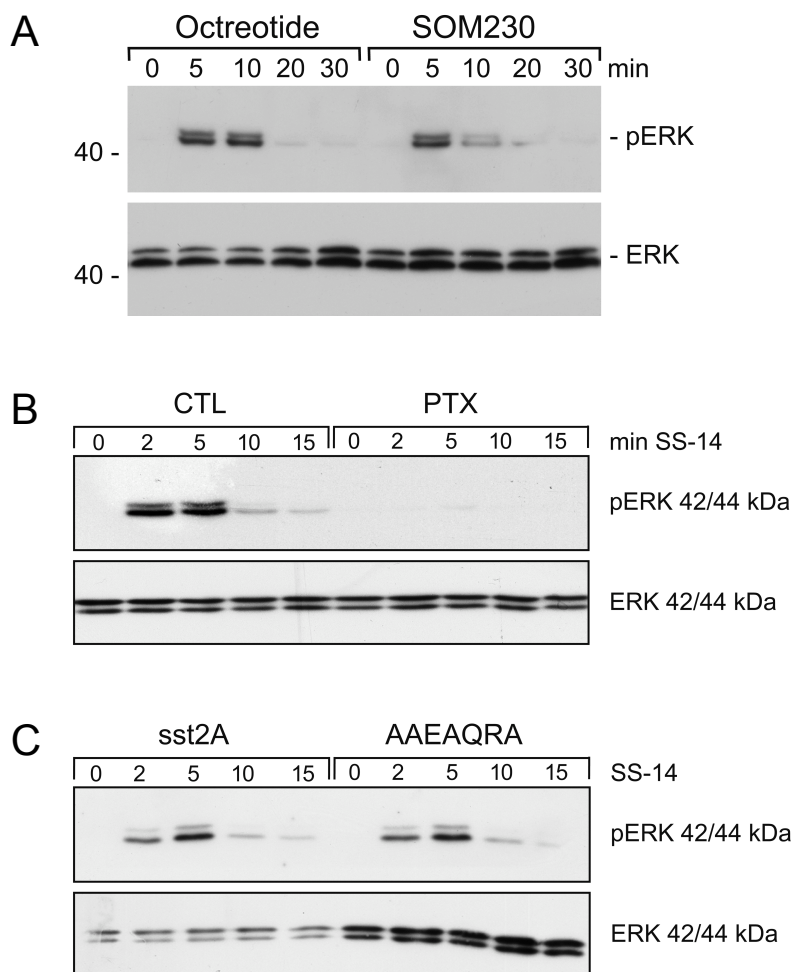
### **3.1.10 Die ERK-Aktivierung wird über $G\alpha_i$ vermittelt und ist unabhängig von der $rsst_{2A}$ -Phosphorylierung**

Der relativ unspezifische *second messenger* ERK, auch p44/42 MAPK genannt (je eine Isoform mit 42 und 44 kDa), wird durch viele extrazelluläre Stimuli wie Mitogene, Wachstumshormone und Zytokine am Threonin<sup>202</sup> und Tyrosin<sup>204</sup> phosphoryliert und somit aktiviert. Auch die Aktivierung des  $rsst_{2A}$ -Rezeptors mit SS-14 und Octreotid führt zu einer Phosphorylierung von ERK. Da bekannt ist, dass  $\beta$ -Arrestin in Zusammenhang mit anderen GPCRs den ERK-Signalweg aktiviert, sollte untersucht werden, inwieweit SOM230 trotz dem Ausbleiben einer  $\beta$ -Arrestin-Translokation eine ERK-Phosphorylierung induziert. Hierzu wurden stabil  $rsst_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen entweder nicht (0 min) oder mit Octreotid oder SOM230 für 5, 10, 20 oder 30 min behandelt, bevor sie direkt lysiert wurden und mittels Western-Blot-Analyse die Gesamtmenge an ERK mit der der phosphorylierten ERK (pERK) verglichen wurde (Abb. 14 A). Für uns überraschend zeigte sich, dass auch SOM230 ERK in einem Maße aktivieren kann, das lediglich schwächer als das von Octreotid zu sein schien.

Somit war anzunehmen, dass das Anschalten des ERK-Signalweges nach  $rsst_{2A}$ -Aktivierung eher über  $G\alpha_i$  vermittelt wird, als über die  $\beta$ -Arrestin-Signalweitergabe. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden stabil  $rsst_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen mit 300 nM Pertussis-Toxin (PTX), einem Inhibitor der  $G\alpha_i$ -Signaltransduktion, für 18 h vorbehandelt, bevor sie für 0, 2, 5 oder 15 min mit 1  $\mu$ M SS-14 stimuliert wurden (Abb. 14 B). Als Kontrolle (CTL) dienten die gleichen Zellen ohne Vorbehandlung. Die

Western-Blot-Analyse mit anti-ERK und anti-pERK machte deutlich, dass die Verhinderung der  $G\alpha_i$ -Aktivität die Phosphorylierung der pERK unterband.

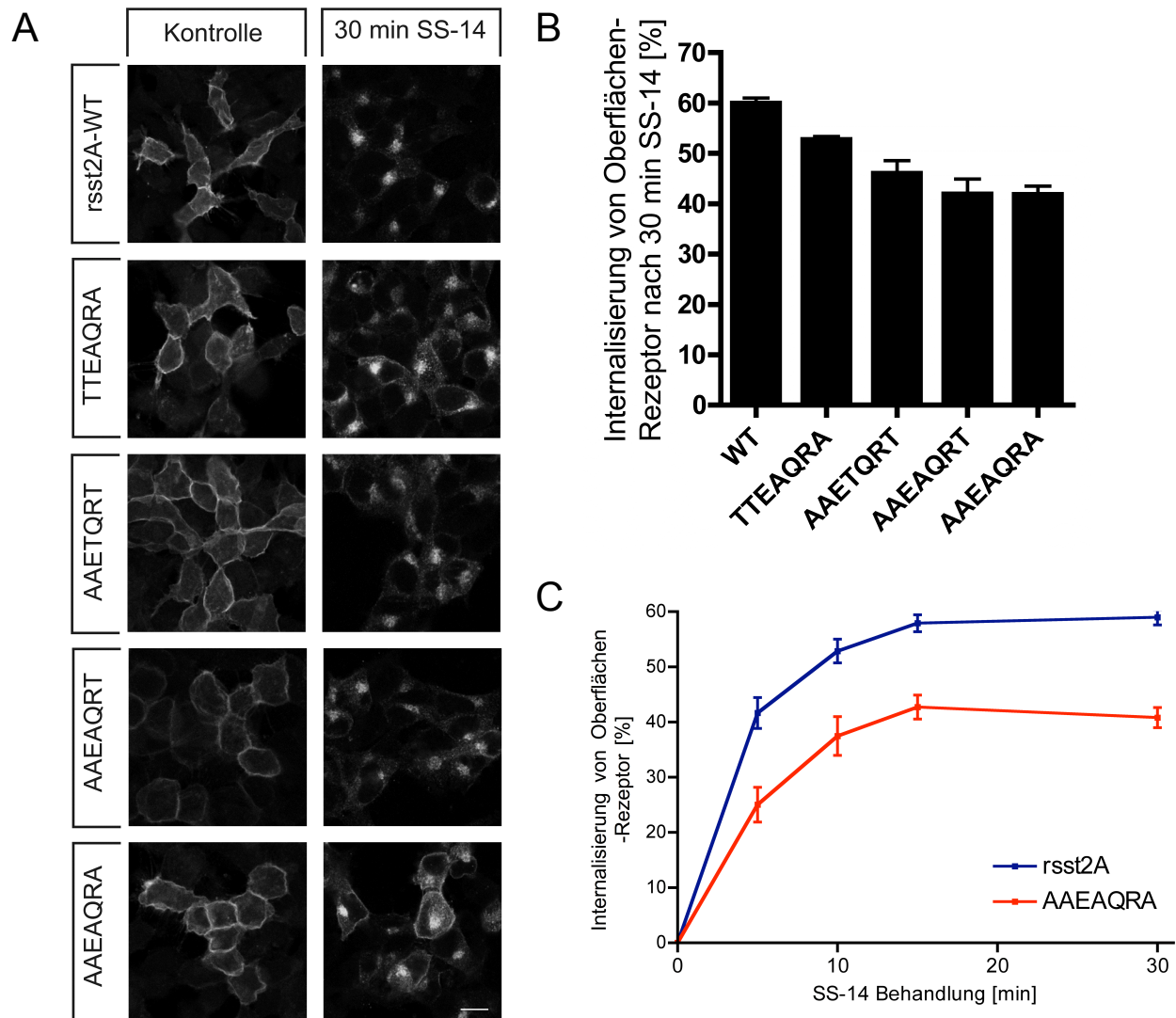
Diese Befunde wiesen darauf hin, dass die Aktivierung der ERK durch den  $rsst_{2A}$  unabhängig von  $\beta$ -Arrestin und eventuell auch von dem Phosphorylierungs-Status des Rezeptors ist. Schließlich folgt die Phosphorylierung erst auf die G-Protein-Signalweitergabe. Aus diesem Grund wurden stabil  $rsst_{2A}$ - oder die  $^{353}AAEAQRA^{359}$ -Mutante-exprimierende HEK-Zellen für 0, 2, 5, 10 oder 15 min mit 1  $\mu$ M SS-14 behandelt und die Aktivierung des ERK-Signalwegs überprüft (Abb. 14 C). Auch die Mutante konnte nach Stimulation ERK-Phosphorylierung induzieren – Allerdings erschien die ERK-Aktivierung vermindert. Die ERK-Aktivierung scheint hauptsächlich über die G-Protein-Signalweitergabe vermittelt zu werden und höchstens zu einem Anteil über  $\beta$ -Arrestin.



**Abb. 14: Die ERK-Aktivierung wird über  $G\alpha_i$  vermittelt.** Stabil transfizierte HEK-Zellen wurden nach der Behandlung lysiert und die Menge der Gesamt-ERK sowie der phosphorylierten ERK (pERK) wurden mit Hilfe der Western-Blot-Analyse ermittelt. Jedes Experiment wurde mind. Zweimal durchgeführt. Die durch den Molekularmasse-Marker ermittelten Größen sind auf der *linken Seite* in kDa angegeben. **(A)** Stabil  $rsst_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 1  $\mu$ M Octreotid oder SOM230 für 5, 10, 20 oder 30 min behandelt bevor sie weiterverarbeitet wurden. **(B)** Stabil  $rsst_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen wurden entweder nicht (CTL) oder für 18 h mit 300 nM Pertussis-Toxin (PTX) präinkubiert, bevor sie für 0, 2, 5, 10 oder 15 min mit 1  $\mu$ M SS-14 stimuliert und weiterverarbeitet wurden. **(C)** Stabil  $rsst_{2A}$ - oder AEAQRA-Mutante-exprimierende HEK-Zellen wurden für 0, 2, 5, 10 oder 15 min mit 1  $\mu$ M SS-14 behandelt, bevor weiterverarbeitet wurden.

### 3.1.11 Die rsst<sub>2A</sub>-Internalisierung wird nicht nur durch die <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Phosphorylierung reguliert.

Naheliegend war eine Überprüfung des Zusammenhangs der Phosphorylierung des Threonin-Clusters und der Internalisierung des Rezeptors anhand der generierten rsst<sub>2A</sub>-Mutanten. In CHO-Zellen - Ovarien-Zellen des chinesischen Hamsters – wurde gezeigt, dass eine rsst<sub>2A</sub>-Mutante ohne jegliche Threonine im C-Terminus eine fünffach verlangsamte Internalisierung nach Agonist-Gabe (100 nM SS-14) zeigt (Liu, Dewi et al. 2008). Die von uns genutzten rsst<sub>2A</sub>-Mutanten haben in jedem Falle noch das Thr<sup>367</sup>, das einzige Threonin des C-Terminus, das außerhalb des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs liegt (Abb. 2). Alle diese Mutanten zeigten in der immunocytochemischen Untersuchung mittels des anti-sst2A-Antikörpers eine deutliche Internalisierung, die allerdings im Vergleich zum Wildtyp verringert ist (Abb. 15 A). Diese Verringerung, ersichtlich aus dem an der Membran verbliebenen Rezeptor-Signal, ist bei der <sup>353</sup>AAEAQRA<sup>359</sup>-Mutante am deutlichsten ausgeprägt. Auch der Internalisierungs-ELISA zeigte für die vier erzeugten rsst<sub>2A</sub>-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Abnahme der Rezeptor-Internalisierung (Abb. 15 B). Die so quantifizierte Internalisierung reichte von 59,9 % Internalisierung beim Wildtyp zu 41,9 bzw. 41,8 % Internalisierung für die <sup>353</sup>AAEAQRT<sup>359</sup>- bzw. <sup>353</sup>AAEAQRA<sup>359</sup>-Mutante, vergleichbar den Werten die in der eben zitierten Arbeit ermittelt wurden (Liu, Dewi et al. 2008). Diese Daten konnten durch einen Zeitverlauf mit 5, 10, 15 und 30-minütiger Behandlung mit 1 µM SS-14, bei der nur der Wildtyp und die <sup>353</sup>AAEAQRA<sup>359</sup>-Mutante ebenfalls mittels Internalisierungs-ELISA verglichen wurden, bestätigt werden (Abb. 15 C). Die Abnahme der Oberflächenrezeptoren liegt für den mutierten Rezeptor bei jedem Zeitpunkt signifikant unter der des Wildtyp-rsst<sub>2A</sub>. Das Fehlen des Threonin-Clusters führt somit zu einer verlangsamten Internalisierungsrate mit einem niedrigeren Maximum. Somit ist das Ausbleiben der Phosphorylierung des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs nach SOM230-Behandlung keine hinreichende Erklärung für das Ausbleiben der rsst<sub>2A</sub>-Internalisierung.



**Abb. 15: Die <sup>353</sup>AAEAQRA<sup>359</sup>-Mutante zeigt eine verlangsamte und reduzierte Internalisierung. (A)** HEK-Zellen, die stabil Wildtyp-rsst<sub>2A</sub>, die <sup>353</sup>TTEAQRA<sup>359</sup>-, die <sup>353</sup>AAETQRT<sup>359</sup>-, die <sup>353</sup>AAEAQRT<sup>359</sup>-, oder die <sup>353</sup>AAEAQRA<sup>359</sup>-Mutante exprimierten, wurden entweder unbehandelt oder nach 30-minütiger Behandlung mit 1  $\mu$ M SS-14 fixiert, immunhistochemisch mit anti-sst2A fluoreszenzmarkiert und mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet. Der Balken entspricht einer Größe von 20  $\mu$ M. **(B)** HEK-Zellen, die stabil Wildtyp-rsst<sub>2A</sub>, die <sup>353</sup>TTEAQRA<sup>359</sup>-, die <sup>353</sup>AAETQRT<sup>359</sup>-, die <sup>353</sup>AAEAQRT<sup>359</sup>-, oder die <sup>353</sup>AAEAQRA<sup>359</sup>-Mutante exprimierten wurden nach 30 min wie unter Methoden beschrieben mittels Internalisierungs-ELISA untersucht. Die Internalisierungs-ELISA-Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt und wurden aus vier unabhängigen Experimenten mit Vierfachbestimmung gewonnen. Die Ergebnisse wurden mittels Zweistichproben t-Test nach Student analysiert und zeigten alle eine signifikante Reduktion der Rezeptor-Internalisierung ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zum Wildtyp. **(C)** Stabil Wildtyp-rsst<sub>2A</sub>- oder <sup>353</sup>AAEAQRA<sup>359</sup>-Mutante-exprimierende HEK-Zellen wurden für 0, 5, 10, 15 oder 30 min mit 1  $\mu$ M SS-14 behandelt und es wurde mittels Internalisierungs-ELISA die Abnahme des Oberflächenrezeptors (0 min entspricht 100 % an der Oberfläche) gemessen. Zu allen überprüften Zeitpunkten liegt die Internalisierungsrate der Mutante nach dem Zweistichproben t-Test nach Student ( $p < 0.05$ ) signifikant unter der des Wildtyps und erreicht Ihr Maximum bei etwa 40 %.

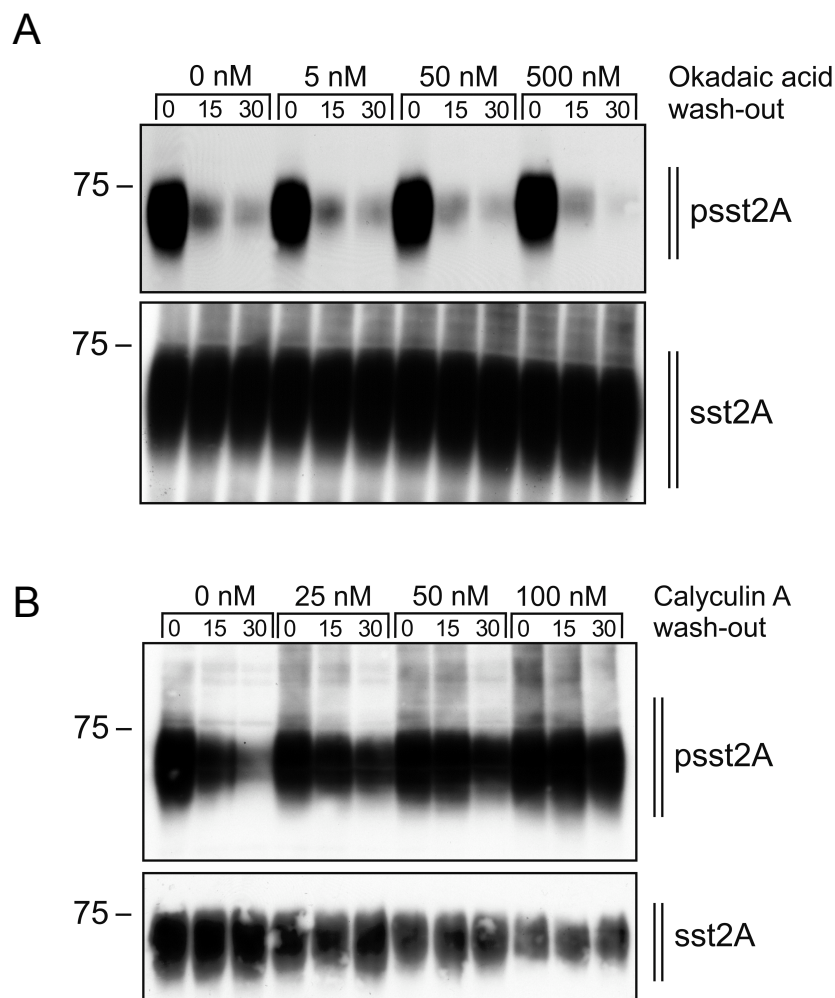
## 3.2 Die Phosphatase-vermittelte Dephosphorylierung des rsst<sub>2A</sub>-Rezeptors

### 3.2.1 Der Phosphatase-Inhibitor Calyculin A, nicht aber Okadainsäure, blockt die rsst<sub>2A</sub>-Dephosphorylierung

Nachdem in Initialen Experimenten eine Dephosphorylierung des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs innerhalb von 30 min nachweisbar war, sollten im Rahmen dieser Arbeit auch die molekularen Mechanismen der raschen rsst<sub>2A</sub>-Dephosphorylierung untersucht werden. Die Serin/Threonin-Proteinphosphatasen der Phosphoprotein-Phosphatasen-(PPP-) Genfamilie vermitteln eine Fülle von biologischen Regulationsprozessen, in denen reversible Phosphorylierung eine Rolle spielt. Diese Familie beinhaltet die Magnesium-unabhängigen Phosphatasen PP1, PP2A, PP2B/Calcineurin, PP4, PP5, PP6 und PP7, die nach ihrer Primärstruktur klassifiziert wurden (Honkanen und Golden 2002).

Zuerst wurden zwei zellpermeable Phosphatase-Inhibitoren eingesetzt: Calyculin A kommt als Metabolit im Meeresschwamm *Discodermia calyx* vor und hat sich als potenter Inhibitor der Proteinphosphatasen PP1, PP2A, PP4 und PP5 erwiesen. Auch die Okadainsäure, benannt nach dem marinen Schwamm *Halichondria okadaei* aus dem sie zuerst isoliert wurde, ist ein etablierter Phosphatase-Inhibitor für die gleichen Ser-/Thr-Phosphatasen, also PP1, PP2A, PP4 und PP5 (Honkanen und Golden 2002). Die durch die Inhibitoren blockierten Phosphatasen wurden schon in vielen anderen Zusammenhängen als wichtige Regulatoren beschrieben (Chinkers 2001; Ceulemans und Bollen 2004; Cohen, Philp et al. 2005; Janssens, Longin et al. 2008). Nun sollten Calyculin A und Okadainsäure getestet werden, um die Phosphatasen, die bei der Dephosphorylierung des rsst<sub>2A</sub> eine Funktion haben, näher zu charakterisieren. Dazu wurden stabil rsst<sub>2A</sub>-exprimierende HEK-Zellen bei einer Konfluenz um 80 % mit 0, 5, 50 oder 500 nM Okadainsäure (Abb. 16 A) oder 0, 25, 50 oder 100 nM Calyculin A (Abb. 16 B) für 10 min vorbehandelt, bevor 1 µM SS-14 hinzugegeben wurde. Calyculin A erwies sich oberhalb einer Konzentration von 100 nM als zu toxisch – es führte zum Absterben der HEK-Zellen. Nach fünfminütiger Stimulation mit SS-14 in Anwesenheit der verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und entweder gleich auf Eis lysiert,

oder in Anwesenheit des entsprechenden Phosphatase-Inhibitors in den angegebenen Konzentrationen für 15 oder 30 min weiter im Brutschrank inkubiert (*wash-out*). Danach wurden auch diese Zellen auf Eis lysiert, wie in Material und Methoden beschrieben, der Rezeptor angereichert und darauf Western-Blot-Analysen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Okadainsäure zu keiner Inhibition der Dephosphorylierung des  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Motivs führte (Abb. 16 A). Die Calyculin A-Behandlung hingegen verursachte eine deutliche, konzentrationsabhängige Hemmung der Dephosphorylierung (Abb. 16 B). Obwohl es zu einer leichten Abnahme der Menge des Gesamtrezeptors kam – trotz Angleichung der eingesetzten Proteinmengen wohl ein Effekt der Inhibitor-Toxizität – war bei einer Konzentration von 100 nM Calyculin A keine Abnahme des anti-psst2A-Signals während der 30 min ohne Agonist zu erkennen. Diese Befunde weisen auf eine Beteiligung einer oder mehreren der inhibierten Phosphatasen hin.

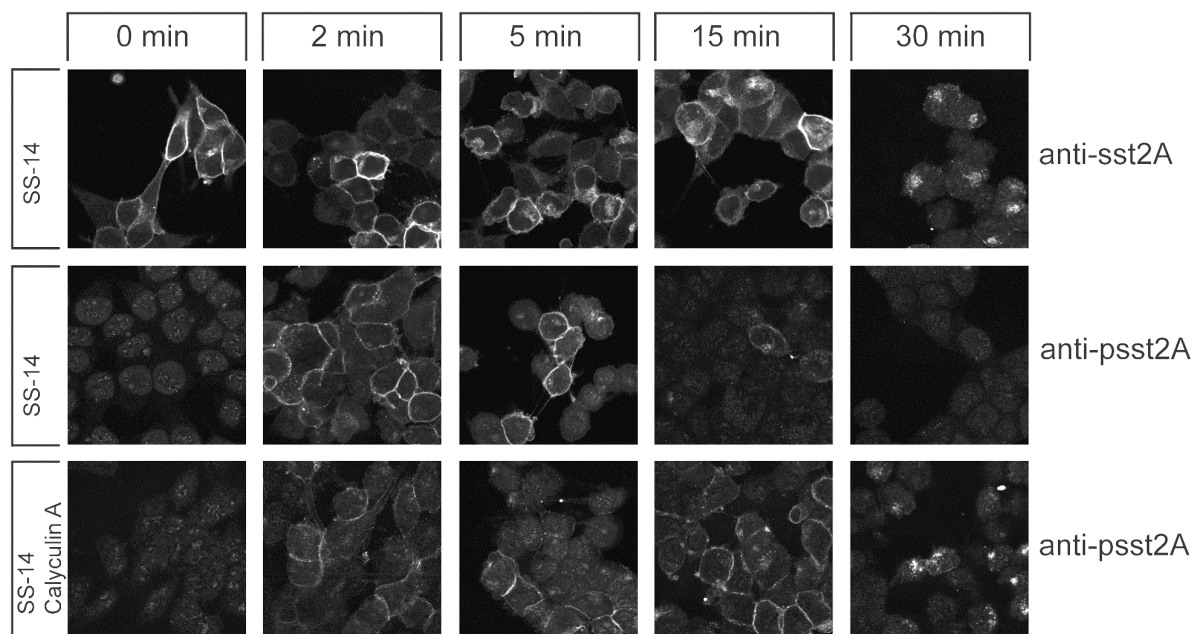


**Abb. 16: Calyculin A, aber nicht Okadainsäure blockt die rsst<sub>2A</sub>-Dephosphorylierung. (A)** Stabil rsst<sub>2A</sub>-exprimierende HEK-Zellen wurden für 10 min entweder nicht oder mit 5, 50 oder 500 nM Okadainsäure (*Okadaic acid*) behandelt bevor 1 µM SS-14 zugegeben wurde. 5 min danach wurden die Zellen gewaschen und entweder weiterverarbeitet oder noch für 15 oder 30 min mit der angegebenen Konzentration von Okadainsäure bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert (*wash-out*), bevor sie weiterverarbeitet wurden. **(B)** Stabil rsst<sub>2A</sub>-exprimierende HEK-Zellen wurden für 10 min entweder nicht oder mit 25, 50 oder 100 nM Calyculin A behandelt, bevor für 5 min 1 µM SS-14 zugegeben wurde. Danach wurden die Zellen gewaschen und entweder weiterverarbeitet oder noch für 15 oder 30 min mit der angegebenen Konzentration von Calyculin A bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert bevor sie weiterverarbeitet wurden. **(A + B)** Die Zellen wurden lysiert und der rsst<sub>2A</sub> angereichert bevor mit der Western-Blot-Analyse der Gesamtrezeptor (anti-sst<sub>2A</sub>, *untere Blots*) und der phosphorylierte rsst<sub>2A</sub> (anti-psst<sub>2A</sub>, *obere Blots*) detektiert wurden. Die durch den Molekularmasse-Marker ermittelten Größen sind jeweils auf der *linken Seite* in kDa angegeben.



Calyculin A blockt die Aktivität von PP1 ( $IC_{50}$ : 0,4 nM), PP2A ( $IC_{50}$ : 0,25 nM), PP4 ( $IC_{50}$ : 0,4 nM) und PP5 ( $IC_{50}$ : 3 nM) höchst potent. Für die Phosphatasen PP2A, PP4 und PP5 weist Okadainsäure ebenfalls eine halbmaximale inhibitorische Konzentration  $\leq 4$  nM auf (PP2A: 0,1 - 0,3 nM, PP4: 0,1 nM, PP5: 3,5 nM). Nur die Aktivität von PP1 kann durch die beiden Toxine unterschieden werden, da diese durch Okadainsäure mit einer  $IC_{50}$  von 20-50 nM etwa 100-fach schwächer inhibiert wird, als durch Calyculin A (Honkanen und Golden 2002; Cohen, Philp et al. 2005).

Um die Inhibition der Dephosphorylierung durch Calyculin A auch immuncytochemisch zu bestätigen, wurden stabil  $rsst_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten Glasplättchen ausgesät bevor die Zellen nicht oder 10 min mit 50 nM Calyculin A behandelt wurden. Dann wurde entweder in Ab- oder Anwesenheit von Calyculin A nicht (0 min) oder für 2, 5, 15 oder 30 min mit 1  $\mu$ M SS-14 stimuliert, bevor die Zellen gewaschen und fixiert wurden. Für jeden Zeitpunkt der Stimulationsdauer sowie für Calyculin A behandelte und unbehandelte Zellen wurden immuncytochemische Fluoreszenzfärbungen mit gegen den Gesamtrezeptor (anti- $sst_{2A}$ ) und auch den phosphorylierten Rezeptor (anti- $psst_{2A}$ ) gerichtete Antikörper angefertigt (Abb. 17).



**Abb. 17: Immuncytochemischer Nachweis der Inhibition der  $rsst_{2A}$ -Dephosphorylierung durch Calyculin A.** Stabil  $rsst_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen wurden 5 min mit 50 nM Calyculin A behandelt, bevor 1  $\mu$ M SS-14 für 0, 2, 5, 15 oder 30 min zugegeben wurde. Dann wurden die Zellen fixiert und immuncytochemisch mit dem anti- $sst_{2A}$  (obere Reihe) oder dem anti- $psst_{2A}$  fluoreszenzgefärbt und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet. Die phospho-unabhängige anti- $sst_{2A}$ -Färbung zeigte keine Unterschiede mit und ohne Calyculin A (mit Calyculin A ist nicht gezeigt).

Es zeigte sich, dass die rsst<sub>2A</sub>-Phosphorylierung bei Calyculin A-inkubierten Zellen erstens länger vorhanden war und zweitens auch intrazellulär, also nach der Rezeptor-Internalisierung, nachweisbar war. Ohne SS-14-Stimulation (0 min) war mit und ohne Calyculin A keine Phosphorylierung zu detektieren, was zeigte, dass es unter Calyculin A nicht schon vor der Agonist-Behandlung zu einer Akkumulation von Phosphaten im <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motiv gekommen war. Im Gegensatz zur verlängerten Phosphorylierung bei Behandlung mit Calyculin A, war bei unbehandelten Zellen schon nach 15 min kaum noch ein anti-psst2A-Signal nachweisbar.

Das phospho-unabhängige anti-sst2A-Signal zeigte deutlich die Internalisierung des rsst<sub>2A</sub>. Für dessen Membrantransport waren keine Unterschiede zwischen Calyculin A-behandelten Zellen und -unbehandelten Zellen (Abb. 17, *obere Reihe*) erkennbar.

Die gleiche Versuchsanordnung mit 200 nM Okadainsäure zeigte weder für die rsst<sub>2A</sub>-Phosphorylierung noch für den -Membrantransport einen Unterschied zwischen Inhibitor-behandelten Zellen und -unbehandelten (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse bestätigten die mittels Western-Blot-Analyse gewonnenen Daten und deuten aufgrund der geringeren inhibitorischen Aktivität von Okadainsäure für die PP1 auf eine Rolle eben dieser Phosphatase am <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motiv hin.

### **3.2.2 Die katalytische Untereinheit $\beta$ der Proteinphosphatase 1 vermittelt die Dephosphorylierung des rsst<sub>2A</sub>**

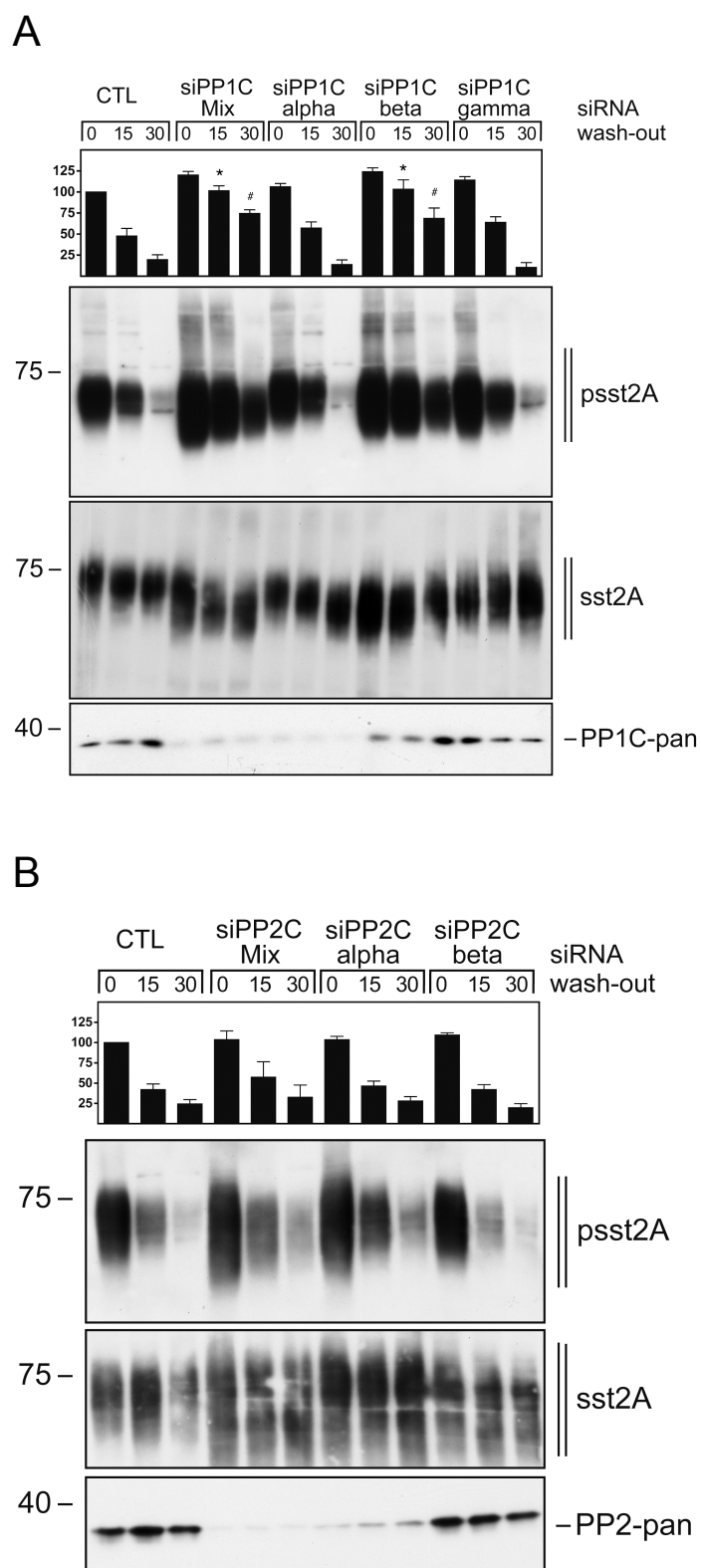
Mit siRNA-Studien sollten sämtliche Proteinphosphatasen, für die eine Inhibition durch Calyculin A bekannt war, überprüft werden. Zum einen konnte durch das Ausbleiben einer Inhibition der vermuteten Phosphatase durch Okadainsäure keineswegs sicher auf die PP1 geschlossen werden, zum anderen erlaubt die siRNA-Methode einen *Knockdown* der einzelnen Isoformen der Proteinphosphatasen. Säugetiere besitzen drei Gene für katalytische Untereinheiten der Proteinphosphatase 1 (PP1C), welche die Isoformen PP1C $\alpha$ , PP1C $\beta$  (auch als PP1C $\delta$  bezeichnet) und zwei Spleißvarianten des dritten Gens (PP1C $\gamma_1$  und PP1C $\gamma_2$ ) kodieren. Den katalytischen Untereinheiten der PP1 stehen hunderte regulatorische Untereinheiten gegenüber, die den gebildeten multimeren Enzymen Spezifität und



Selektivität verleihen, sowie deren Lokalisation und Aktivität regulieren (Virshup und Shenolikar 2009).

Abgesehen von der im Hoden angereicherten katalytischen Isoform PP1C $\gamma_2$ , werden diese Isoformen ubiquitär exprimiert – und sind somit Kandidaten für das  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Motiv und sollten mittels siRNA untersucht werden (Ceulemans und Bollen 2004): Stabil rsst<sub>2A</sub>-exprimierende HEK-Zellen wurden mit siRNA-Duplexen gegen die mRNA von den drei katalytischen Untereinheiten der PP1,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , oder aller drei (siPP1-Mix) transfiziert (Abb. 18 A). Als Kontrolle (CTL) diente eine siRNA die keine mRNA bindet. Drei Tage später wurden die Zellen für 5 min mit 1  $\mu\text{M}$  SS-14 behandelt. Es folgte das Abwaschen des Agonisten und die Zellen wurden im Inkubator für 0, 15 oder 30 min inkubiert (*wash-out*). Darauf folgte direkt die Zelllyse, die Anreicherung der Rezeptor-Proteine und die Western-Blot-Analyse. Aus den Lysaten wurden Proben entnommen, die mittels Western-Blot-Analyse mit einem Pan-PP1C-Antikörper auf den *Knockdown* der PP1C-Untereinheiten überprüft wurden. Dabei schien es, als ob das Signal des PP1C-Antikörpers maßgeblich auf die Abundanz des PP1C $\alpha$  zurückzuführen war. Inwieweit dadurch die tatsächlichen Mengenverhältnisse der PP1C-Untereinheiten in HEK-Zellen abgebildet wurden, ist nicht auszumachen, da der Pan-Antikörper unterschiedliche Affinitäten für die drei Isoformen haben könnte.

Aus dem anti-psst2A-Blot und der Quantifizierung kann man ansehen, dass der *Knockdown* der PP1C $\beta$  alleine für die Inhibition der Dephosphorylierung ebenso wirkungsvoll wie der *Knockdown* aller drei PP1C-Isoformen (PP1C-Mix) war. Die siRNAs gegen die  $\alpha$ - sowie auch die  $\gamma$ -Untereinheit erwiesen sich als wirkungslos in Bezug auf die Dephosphorylierungs-Geschwindigkeit des  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Motivs. Während die Stärke des Phosphorylierungs-Signals bei Reduktion der PP1C $\beta$  sowie aller drei Untereinheiten (PP1C-Mix) nach 15- und 30-minütigem Auswaschen von SS-14 signifikant höher war, als bei der Kontroll-siRNA, zeigte sich für die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Isoform zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied.



**Abb. 18: siRNA-Knockdown der katalytischen Untereinheiten von PP1 und PP2A. (A)** Stabil  $rsst_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen wurden mit siRNA-Sequenzen, die gegen die katalytischen Untereinheiten der PP1 (siPP1C)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , alle drei Isoformen (Mix) oder kein Ziel (CTL) gerichtet waren, transfiziert. 3 Tage später wurde für 5 min mit 1  $\mu$ M SS-14 stimuliert und die Zellen vor der Lyse für 0, 15 oder 30 min in Abwesenheit von SS-14 inkubiert (*wash-out*). **(B)** Stabil  $rsst_{2A}$ -exprimierende HEK-Zellen wurden mit siRNA-Sequenzen, die gegen die katalytischen PP2A-Untereinheiten (siPP2C)  $\alpha$ ,  $\beta$ , beide Isoformen (Mix) oder kein Ziel (CTL) gerichtet waren, transfiziert. 3 Tage später wurde für 5 min mit 1  $\mu$ M SS-14 stimuliert und die Zellen vor der Lyse für 0, 15 oder 30 min in Abwesenheit von SS-14 inkubiert (*wash-out*). **(A + B)** Für die Western-Blot-Analyse der gesamten und der phosphorylierten Rezeptoren als auch der PP1C und PP2C wurden die gleichen Proteinmengen eingesetzt und die anti-psst2A-Signale wurden, wie unter Methoden beschrieben, quantifiziert. Die jeweiligen Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen wurden gleich 100 % gesetzt. Die Daten korrespondieren mit dem Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung von mindestens 4 unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse wurden mit dem Zweistichproben t-Test nach Student analysiert (\*,  $p < 0.05$ , signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrolle nach 15-minütigem Auswaschen, #,  $p < 0.05$ , signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrolle nach 30-minütigem Auswaschen). Für die siRNAs gegen PP1C $\alpha$ , PP1C $\beta$  und denen, die gegen PP2AC gerichtet waren, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die durch den Molekularmasse-Marker ermittelten Größen sind jeweils auf der linken Seite in kDa angegeben.

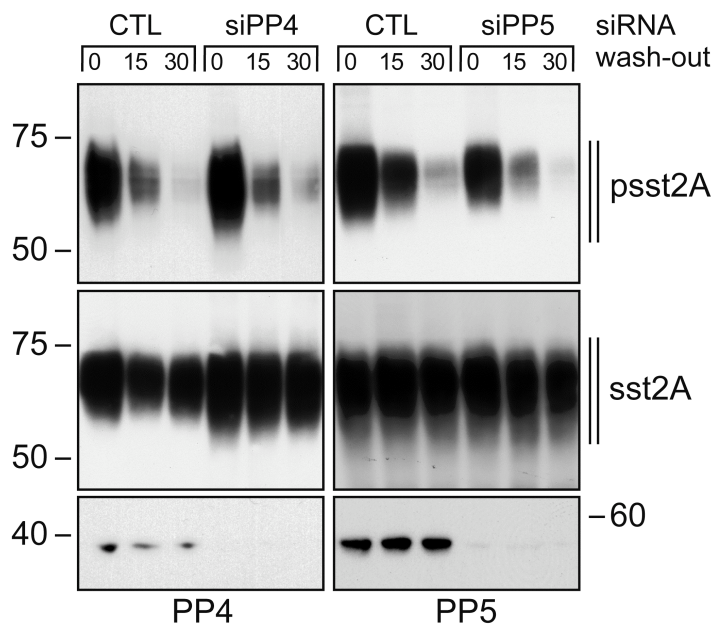
Bemerkenswert war auch die Veränderung des phosphorylierungs-unabhängigen anti-sst2A-Signals. Die Behandlung der Zellen mit PP1 $\beta$ -siRNA und die mit allen drei PP1C-siRNAs gleichzeitig führte in der Western-Blot-Analyse zu einer Verlängerung

des Rezeptorsignals, sodass es über einen größeren kDa-Bereich hinweg detektierbar war. Dies könnte auf eine Vergrößerung des Proteins durch Phosphorylierungen, eventuell auch außerhalb des  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Motivs, zurückzuführen sein.

Es sollte auch der Einfluss der PP2A untersucht werden. Die PP2A liegt im Organismus vor allem als Heterotrimer vor: Eine der zwei katalytischen Untereinheiten (PP2C $\alpha$  oder PP2C $\beta$ ) bindet an eine der beiden bislang bekannten Gerüst-Untereinheiten. Erst dann kann eine aus der Vielzahl der regulatorischen Untereinheiten gebunden werden (Sontag 2001; Virshup und Shenolikar 2009). Wie bei der PP1 ist es also auch für die Überprüfung der Funktion der PP2A hinreichend, die katalytischen Untereinheiten mittels siRNA-*Knockdown* zu untersuchen. Insgesamt wurde das Verfahren beibehalten und es wurden siRNAs gegen die beiden Untereinheiten alleine bzw. zusammen (Mix) mit der siRNA ohne Zielsequenz (CTL) verglichen (Abb. 18 B). Die Überprüfung der Reduktion der Isoformen wurde mittels anti-PP2A-Antikörper, der beide katalytischen Untereinheiten detektiert, vorgenommen. Die Quantifizierung von fünf Experimenten ergab keine signifikante Veränderung der Abnahme der Dephosphorylierungs-Geschwindigkeit für eine der untersuchten Bedingungen im Vergleich zur Kontroll-Bedingung. Allerdings wurde für die siPP2C-transfizierten Zellen ebenfalls eine Verlängerung des Gesamtrezeptor-Signals beobachtet, eventuell wegen der verminderten Dephosphoylierung an anderen Stellen des Rezeptors.

Nach den katalytischen Untereinheiten der PP1 und PP2A sollte noch überprüft werden, ob die PP4 oder die PP5, deren Aktivität auch durch Calyculin A und Okadainsäure inhibiert werden kann, einen Anteil an der schnellen Dephosphorylierung des  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Motivs haben. Für die PP4 ist, vergleichbar der PP2A, auch die Bildung eines heterotrimeren Komplexes aus katalytischer, gerüstbildender und regulatorischer Untereinheit notwendig. Allerdings gibt es von der katalytischen Untereinheit keine Isoformen (Virshup und Shenolikar 2009). Die PP5 vereint die subzellulären Lokalisationssequenzen, eine autoinhibitorische (also regulatorische) und eine katalytische Domäne in einer Peptidkette (Chinkers 2001). Das bedeutet, man kann die Aktivität dieser Phosphatasen mit jeweils einer siRNA inhibieren. Abbildung 19 zeigt exemplarische Ergebnisse von Western-Blot-Analysen

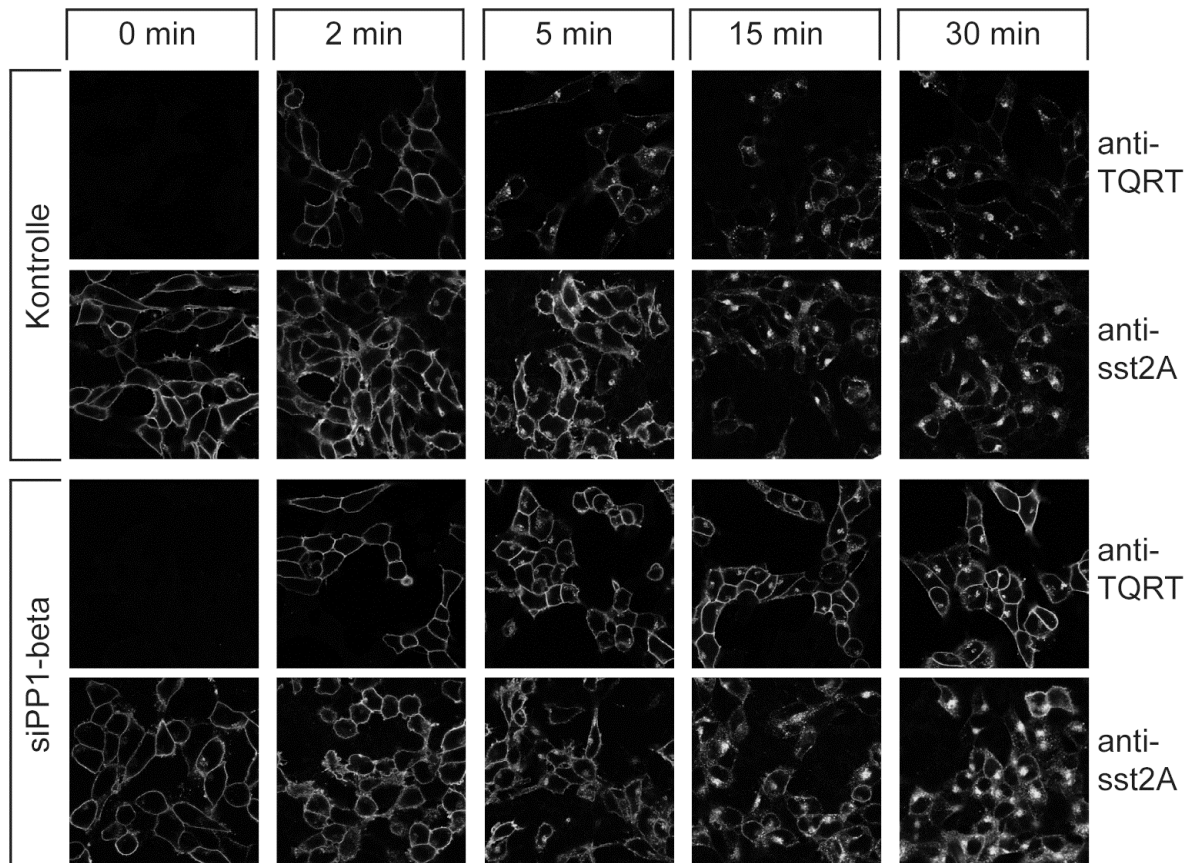
von siRNA-Experimenten, die nach dem etablierten Muster durchgeführt wurden. Weder der *Knockdown* der katalytischen Untereinheit der PP4 (*links*) noch der von PP5 (*rechts*) führte zu einer Veränderung der Dephosphorylierung der Threonine im C-Terminus des rsst<sub>2A</sub>. Allerdings zeigte sich bei siPP4-, nicht aber bei siPP5-Transfektion, wieder die Verlängerung des anti-sst2A-Signals, das nicht zugeordnet werden kann.



**Abb. 19: siRNA-Knockdowns von PP4 und PP5 zeigen keinen Effekt auf die rsst<sub>2A</sub>-Dephosphorylierung.** Stabil rsst<sub>2A</sub>-exprimierende HEK-Zellen wurden mit siRNA-Sequenzen gegen kein Ziel (CTL), die katalytische Untereinheit der PP4 (siPP4) oder die PP5 (siPP5) transfiziert. Drei Tage später wurde für 5 min mit 1  $\mu$ M SS-14 stimuliert und die Zellen vor der Lyse für 0, 15 oder 30 min in Abwesenheit von SS-14 inkubiert (*wash-out*). Mittels Western-Blot-Analyse wurden sowohl die Mengen des gesamten (anti-sst2A) und des phosphorylierten rsst<sub>2A</sub> (anti-psst2A), als auch der *Knockdown* von PP4 und PP5 nachgewiesen. Die abgebildeten Western-Blots sind repräsentativ für jeweils 3 unabhängige Experimente. Die durch den Molekularmasse-Marker ermittelten Größen sind in kDa angegeben.

Die durchgeführten siRNA-Studien deuteten auf eine maßgebliche Dephosphorylierungs-Aktivität, die auf die Agonist-induzierte Phosphorylierung der vier untersuchten Threonine folgt, der PP1C $\beta$  hin. Andere Phosphatasen der PPP-Familie schienen keine Funktion für diese Dephosphorylierung zu haben.

Eine immuncytochemische Untersuchung des Effekts der siRNA gegen PP1C $\beta$  könnte zum einen die mittels Western-Blot-Analyse gezeigten Befunde bekräftigen und zum anderen eventuell Aufschlüsse über die räumlichen Abläufe der Dephosphorylierung mit sich bringen. Also wurden stabil rsst<sub>2A</sub>-exprimierende HEK-Zellen mit der PP1C $\beta$ -siRNA transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen in einer Zeitreihe für 0, 2, 5, 15 oder 30 min mit 1  $\mu$ M SS-14 behandelt bevor sie fixiert und immuncytochemisch mit dem anti-psst2A(Thr356/Thr359)-Antikörper oder dem anti-sst2A-Antikörper Fluoreszenz-markiert wurden (Abb. 20). Der anti-psst2A(Thr356/Thr359)- wurde anstatt dem anti-psst2A-Antikörper eingesetzt, da er deutlich bessere Ergebnisse



**Abb. 20: Der Knockdown der PP1C $\beta$  führt zu einer lang anhaltenden Phosphorylierung des rsst<sub>2A</sub> an der Membran.** Stabil rsst<sub>2A</sub>-exprimierende HEK-Zellen wurden mit siRNA ohne mRNA-Zielsequenz (CTL) oder gegen die PP1C $\beta$  transfiziert. Drei Tage später wurden die Zellen entweder nicht oder für 2, 5, 15 oder 30 min mit 1  $\mu$ M SS-14 stimuliert. Dann wurden die Zellen fixiert und immuncytochemisch mit dem anti-sst2A- oder dem anti-psst2A-Antikörper Fluoreszenz-gefärbt und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet. Der phospho-unabhängige anti-sst2A-Antikörper zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden transfizierten siRNAs.

erzielte. Durch die Fluoreszenz-Färbungen mittels dem anti-psst2A-Antikörper vor der Affinitätsreinigung, hatten wir den Eindruck gewonnen, dass die <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Phosphorylierung direkt an der Plasmamembran und in den ersten Minuten nach der Stimulation entfernt wird. Mit dem durch Affinitätsreinigung gewonnenen anti-psst2A(Thr356/Thr359)-Antikörper konnte eine Internalisierung des Rezeptors mit einer länger verbleibenden Phosphorylierung, wenigstens an den zwei vom eingesetzten Antikörper detektierten Threoninen, nachgewiesen werden. Dies war aus Vorversuchen mit dem anti-psst2A(Thr356/Thr359)-Antikörper bekannt, ist aber auch deutlich in Abbildung 20 bei der Kontroll-Bedingung zu erkennen. Auch dieser Befund deutet auf eine membrannähe Dephosphorylierung des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs hin.

## 4 Diskussion

### 4.1 Agonist-selektive Phosphorylierung des rsst<sub>2A</sub>-Rezeptors am <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motiv

Die Agonist-induzierte Regulation des rsst<sub>2A</sub>-Somatostatin Rezeptors geht mit der schnellen Phosphorylierung von einigen Phosphatakzeptor-Stellen innerhalb des intrazellulären C-terminalen Endes des Rezeptors einher. Vor Beginn der hier vorgestellten Arbeiten war durch Versuche mit einer Serie von C-terminal verkürzten rsst<sub>2A</sub>-Trunkationsmutanten und zielgerichteten Mutationsstudien bekannt, dass die vier Threonine des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs die primären Akzeptor-Stellen für die Agonist-induzierte Phosphorylierung des rsst<sub>2A</sub> sind (Tulipano, Stumm et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit kamen drei phosphospezifische Antikörper gegen diese vier Threonine des sst<sub>2A</sub> – sie binden auch am humanen sst<sub>2</sub>-Rezeptor – zum Einsatz: Zunächst wurde der anti-psst2A-Antikörper generiert und charakterisiert. Dann wurden mittels Affinitätsreinigung dieses polyklonalen Antikörpers gegen Phosphopeptide die Antikörper psst2A(Thr353/Thr354) und psst2A(Thr356/Thr359) gewonnen. Auch diese wurden eingehend charakterisiert. Mit Hilfe dieser drei Antikörper und weiterführenden Mutationsstudien konnte nun gezeigt werden, dass die Bindung eines vollen Agonisten Voraussetzung für die Phosphorylierung aller vier Threonine ist. Nach Behandlung mit SS-14 war eine schnelle Phosphorylierung in Ratten-Hypophysen-GH<sub>3</sub>-Zellen, in Pankreas-Insulinom-INS1-Zellen und in menschlichen HEK293-Zellen zu beobachten. Diese Phosphorylierung war Dosis-abhängig (Pöll et al., akzeptiert) und Agonist-selektiv: SS-14, Octreotid und L-779,976, aber nicht SOM230 riefen eine rasche und deutliche Phosphorylierung des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs hervor.

Überexpressions- und siRNA-*Knockdown*-Experimente konnten belegen, dass GRK2 und GRK3 die <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-phosphorylierenden Kinasen sind. Eine Reduktion der Aktivität einer dieser beiden GRKs konnte durch die jeweils andere ausgeglichen werden. Es handelt sich also um ein redundantes Phosphorylierungs-System, dass vermutlich auf die nahe Verwandtschaft dieser beiden GRKs zurückzuführen ist. Die Beteiligung der ebenfalls miteinander eng verwandten Kinasen GRK5 und GRK6, die

aufgrund ihres Expressionsmusters auch für die Phosphorylierung des rsst<sub>2A</sub> in Frage gekommen wären, konnte mittels siRNA-Studien ausgeschlossen werden. Das <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motiv war auch kein Substrat für die *Second-Messenger*-Kinasen PKA und PKC, wie durch Stimulationsversuche mit PMA und Forskolin gezeigt werden konnte. Vermutlich werden die untersuchten Threonine ausschließlich von der GRK2 und GRK3 phosphoryliert. Dass der siRNA-vermittelte *Knockdown* beider Kinasen nicht zu einem vollständigen Ausbleiben des anti-psst2A-Signals führte, könnte der Tatsache geschuldet sein, dass durch siRNAs nur eine Verringerung der Protein-Abundanz erreicht werden kann. Ein Protein-*Knockdown* kann als gelungen gelten, wenn ein Protein-Level von unter 20 % des normalen Vorkommens erreicht wird. Inwieweit die Aktivität der verbliebenen 20 % geringer ist, als die 100 % dieses Enzyms, kann im Falle der GRKs höchstens geschätzt werden. Es kann also nicht der Schluss gezogen werden, dass die durch siRNA-Transfektion gegen GRK2 und GRK3 erreichte Reduktion des Phosphorylierungssignals von etwa 40 % genau dem Anteil der GRK2- und GRK3-vermittelten Phosphorylierung entsprechen – es sollte sich um einen maßgeblich größeren Anteil handeln.

Beim siRNA-*Knockdown* der GRK3 alleine deutete sich sogar eine Verstärkung des anti-psst2A-Signals an. Vielleicht hat GRK2 an diesen Phosphorylierungsstellen eine stärkere Aktivität als GRK3. Bei Reduktion der GRK3 wäre, wie bei einer Konkurrenz, die Gleichgewichtskonstante zur GRK2-Aktivität hin verschoben. Dafür spricht auch, dass sich beim *Knockdown* der GRK2 alleine eine kleine Abschwächung des Phosphosignals zeigte.

#### **4.1.1 Regulation der rsst<sub>2A</sub>-Internalisierung durch <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Phosphorylierung**

Der Membrantransport der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wird maßgeblich durch  $\beta$ -Arrestin-Bindung an aktivierungs-abhängigen Phosphorylierungen an cytoplasmatischen Teilen des Rezeptors reguliert (Oakley, Laporte et al. 2000; Oakley, Laporte et al. 2001; Ahn, Shenoy et al. 2004).  $\beta$ -Arrestin bindet relativ unspezifisch an Phosphat-Cluster. Die SS-14 Stimulation einer rsst<sub>2A</sub>-Mutante, die keinen C-terminalen Phosphat-Cluster besitzt (<sup>353</sup>AAEAQRT<sup>359</sup>-Mutante), konnte keinen  $\beta$ -



Arrestin-Transport an die Plasmamembran bewirken (Tulipano, Stumm et al. 2004). Des Weiteren war bekannt, dass auf die Agonist-induzierte Phosphorylierung des  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Motivs die Internalisierung des  $\text{rsst}_{2A}$  folgte (Tulipano, Stumm et al. 2004). Somit war die Ausgangshypothese für diese Arbeiten, dass die Phosphorylierung des untersuchten Threonin-Clusters eine Vorbedingung für die  $\text{rsst}_{2A}$ -Internalisierung darstellt. Es zeigte sich, dass SOM230, das keine oder nur eine minimale  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Phosphorylierung induzierte auch zu keiner Internalisierung des Rezeptors führte. Die untersuchten vollen Agonisten, SS-14, Octreotid und L-779,976, indes führten zu einer starken Abnahme des Oberflächenrezeptors, wie durch immuncytochemische und Internalisierungs-ELISA-Studien gezeigt werden konnte. Es ergab sich eine nahezu perfekte Korrelation des  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Phosphorylierungsstatus, gemessen als anti-psst2A-Signal, mit der  $\text{rsst}_{2A}$ -Internalisierung. So führte die Koexpression von GRK2 für alle untersuchten Agonisten, also auch SOM230, sowohl zu einer Erhöhung der Phosphorylierungs-Intensität als auch zu einer verstärkten  $\text{rsst}_{2A}$ -Internalisierung. Bei der Blockade der Phosphorylierung durch die Behandlung mit dem Antagonisten BIM-23627 vor der SS-14-Gabe war auch die Internalisierung vollständig blockiert. Dass der  $\beta$ -Arrestin-2-EGFP-Transport an die Membran nach SOM230-Behandlung ausblieb, aber in Verbindung mit einer GRK2-Überexpression herbeigeführt werden konnte, passt zur Vorstellung der  $\beta$ -Arrestin-vermittelten GPCR-Internalisierung. Wie erwartet, wurde durch SS-14-Stimulation eine dramatische Umverteilung von  $\beta$ -Arrestin-2-EGFP vom Cytosol an die Membran induziert. Das deutet auf eine relativ stabile Komplexbildung zwischen  $\beta$ -Arrestin-2 und dem Somatostatin-Rezeptor hin. Die Bindung zwischen den Proteinen konnte durch die Überexpression von GRK2 noch weiter stabilisiert werden, wie an der gemeinsamen Internalisierung von  $\text{rsst}_{2A}$  und  $\beta$ -Arrestin-2-EGFP in die gleichen Vesikel zu erkennen war.

Überraschender Weise ist die  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Phosphorylierung ein Regulator der  $\text{rsst}_{2A}$ -Internalisierung, aber keine Vorbedingung für die Internalisierung an sich, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte: Die eingesetzten  $\text{rsst}_{2A}$ -Mutanten konnten, mit abnehmender Anzahl ihrer C-terminalen Threonine, zu einem kleiner werdenden Prozentsatz internalisiert werden, wie mittels Immuncytochemie und Internalisierungs-ELISA gezeigt werden konnte. Von der  $\text{rsst}_{2A}$ -Mutante, die den



gesamten Phosphorylierungs-Cluster nicht besitzt ( $^{353}\text{AAEAQRA}^{359}$ -Mutante), konnte durch Somatostatin-Behandlung 40 % des gesamten oberflächenständigen Rezeptors internalisiert werden, während für den Wildtyp- $\text{rsst}_{2A}$  ca. 60 % erreicht wurden. Und das obwohl der Austausch von drei Threoninen zu Alaninen des untersuchten Motivs ( $^{353}\text{AAEAQRT}^{359}$ -Mutante) dazu führt, dass der Rezeptor  $\beta$ -Arrestin nicht an die Membran rekrutieren kann (Tulipano, Stumm et al. 2004).

Es gab aber auch andere Hinweise, dass die cytosomale Phosphorylierung keine Vorbedingung für die Internalisierung des  $\text{rsst}_{2A}$  ist: Eine Trunktationsmutante, der die letzten 20 AS (Trunktationsmutante  $\text{rsst}_{2A}$ -349X) und somit die vier untersuchten Threonine fehlen und die in Ganz-Zell-Phosphorylierungs-Studien eine um 80 % verringerte Phosphorylierung zeigte, internalisierte konstitutiv, also unabhängig von einer Agonist-Stimulation. Eine andere Trunktationsmutante, der die C-terminalen 44 AS fehlen ( $\text{rsst}_{2A}$ -325X) internalisiert wiederum nur Agonist-induziert (Schwarkop, Kreienkamp et al. 1999). Dies ist bemerkenswert, da dieser Mutante fast der gesamte „Schwanz“ nach der siebten Transmembrandomäne fehlt (vgl. Abb. 2) und diese als entscheidend für die Regulation des Agonist-induzierten Membrantransports von GPCRs gesehen wird. Die eben zitierten Studien mit den Trunktationsmutanten wurden ebenfalls an HEK293-Zellen durchgeführt.

Mittlerweile wurde eine Arbeit veröffentlicht, die zeigt, dass eine  $\text{rsst}_{2A}$ -Mutante ohne jegliche Threonine (Thr-) im C-Terminus nach SS-14-Behandlung eine fünffach verlangsamte Internalisierung aufweist und das keine  $\beta$ -Arrestin-Bindung an den Rezeptor stattfindet. Das Gleiche gilt für die Mutante ohne Threonine und Serine (Ser-/Thr-) (Liu, Dewi et al. 2008).

Zusammenfassend ist das Ausbleiben der Phosphorylierung des  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Motivs nach SOM230-Behandlung keine hinreichende Erklärung für das Ausbleiben der  $\text{rsst}_{2A}$ -Internalisierung. Zu erwarten wäre lediglich eine verlangsamte und in ihrem Maximum um etwa 20 % reduzierte Internalisierung im Vergleich zu einem vollen Agonisten – so wie sie mit der  $^{353}\text{AAEAQRA}^{359}$ -Mutante nachgewiesen wurde. Dieses Verhalten zeigt der  $\text{hsst}_{2A}$ , der mit der Internalisierungs-ELISA-Methode untersucht wurde: Während SS-14 und Octreotid einen Verlust von Oberflächenrezeptor von ~ 80 % induzieren, führt SOM230 mit einem flacheren Kurvenverlauf zu einem Maximum um 60 % (Lesche, Lehmann et al. 2009). Die

Phosphorylierung des  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Motivs – induzierbar durch SS-14 und Octreotid – bleibt aber auch beim  $\text{hsst}_{2A}$  nach SOM230-Behandlung aus (unveröffentlichte Daten).

Rezeptoren, die Clathrin-abhängig internalisieren, werden in Clathrin-bestückte Vertiefungen (*clathrin-coated pits*, *CCPs*) gesammelt, um dann Dynamin-abhängig endocytiert zu werden. Dieser Prozess wird über  $\beta$ -Arrestin vermittelt, da es ein Gerüst-Protein für Clathrin, für das Adapter-Protein-2 (AP-2) und für Phosphoinositole ist, und diese Komplexbildung der Internalisierung vorangeht (Moore, Milano et al. 2007). Die Clathrin-abhängige Internalisierung gilt als die Hauptform der GPCR-Internalisierung. Neben dieser gibt es noch Caveolae-abhängige und die Clathrin/Caveolae-unabhängige Internalisierungswege, die insbesondere mit der konstitutiven Internalisierung einiger GPCRs in Zusammenhang gebracht werden (Moore, Milano et al. 2007). Allerdings wurde die konstitutive Internalisierung beim  $\text{rsst}_{2A}$ , abgesehen von der  $\text{rsst}_{2A}$ -349X-Trunktionsmutante, nicht beobachtet. Nichtsdestotrotz könnte der Anteil der  $\text{rsst}_{2A}$ -Internalisierung, die unabhängig von der  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Phosphorylierung abläuft, auf diese beiden alternativen Internalisierungs-Mechanismen zurückzuführen sein. Wenn man die Daten der  $^{353}\text{AAEAQRA}^{359}$ -Mutante im Vergleich zum  $\text{rsst}_{2A}$ -Wildtyp zugrunde legt, dann beläuft sich dieser Anteil auf etwa 2/3 des internalisierten Rezeptors (40 % bzw. 60 % gemessene Internalisierung vom gesamten Oberflächenrezeptor).

Die  $^{353}\text{TTETQRT}^{359}$ -Phosphorylierung verstärkt also die  $\text{rsst}_{2A}$ -Internalisierung, ist aber keine Vorbedingung für diese und induziert sie offenbar auch nicht. Es muss Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein, ob die Internalisierung von anderen Phosphorylierungsstellen abhängt oder doch die Konformation des Rezeptors hinreichend für eine Internalisierung ist. Für weitere notwendige Phosphorylierungen spricht, dass auch  $\text{Ser}^{341}$ ,  $\text{Ser}^{343}$  und  $\text{Ser}^{348}$  Agonist-induziert phosphoryliert werden (Liu, Bee et al. 2009). Andererseits sind diese Serine in der Trunktionsmutante ohne die C-terminalen 44 AS ( $\text{rsst}_{2A}$ -325X), die Agonist-induziert internalisiert wird, nicht vorhanden (Schwarkop, Kreienkamp et al. 1999). Und eine Mutante, der alle Serine der dritten intrazellulären Schleife ( $\text{Ser}^{237}$ ,  $\text{Ser}^{238}$ ,  $\text{Ser}^{244}$ ,  $\text{Ser}^{245}$  und  $\text{Ser}^{250}$ ) sowie auch alle Serine des C-Terminus ( $\text{Ser}^{322}$ ,  $\text{Ser}^{333}$ ,  $\text{Ser}^{341}$ ,  $\text{Ser}^{343}$ ,  $\text{Ser}^{348}$  und  $\text{Ser}^{368}$ ) fehlen, zeigt keine Unterschiede in Bezug auf die

Rezeptorinternalisierung im Vergleich zum rsst<sub>2A</sub>-Wildtyp. Diese Mutante desensitisierte lediglich schwächer als der Wildtyp-Rezeptor (Liu, Dewi et al. 2008). Somit spricht gegenwärtig mehr dafür, dass eine bestimmte Konformation des Rezeptors eine Internalisierung herbeiführt. Eventuell eine Konformation, die der Trunktationsmutante, die konstitutiv internalisiert (rsst<sub>2A</sub>-349X), vergleichbar ist.

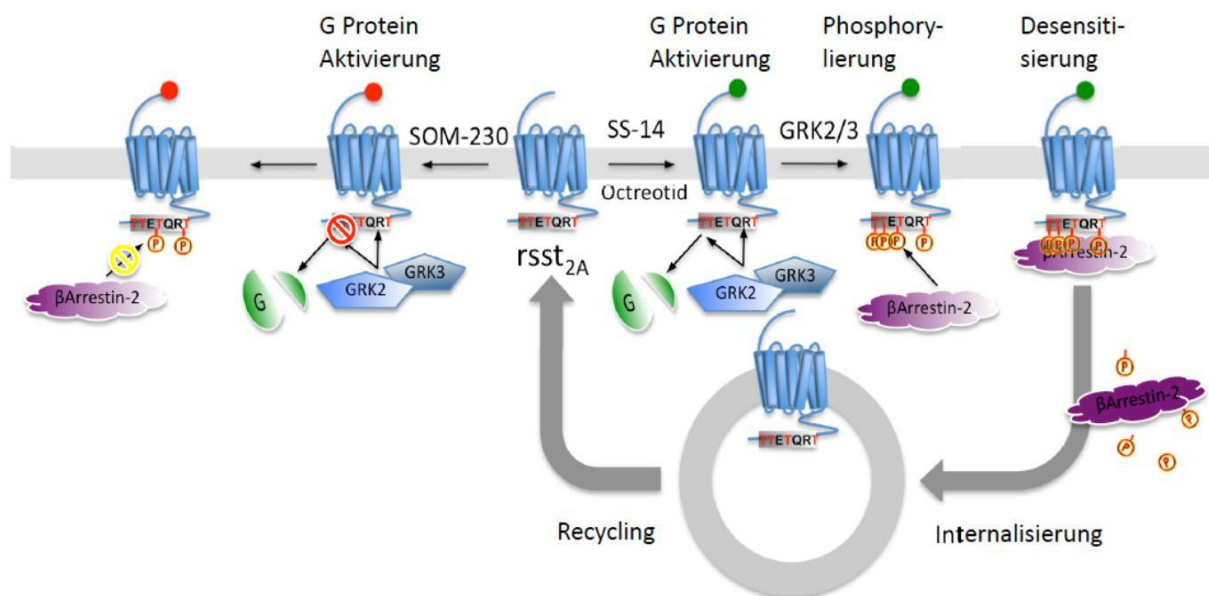
In weiterführenden Arbeiten sollte untersucht werden, über welche Mechanismen der rsst<sub>2A</sub> internalisiert wird und wenn es mehr als einen Mechanismus gibt, ob diese unter verschiedenen Bedingungen aktiviert werden. Für den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor ist beispielsweise bekannt, dass er nach PKA-vermittelter Phosphorylierung über Caveolae, nach GRK-vermittelter Phosphorylierung über den Clathrin-vermittelten Weg internalisiert (Rapacciuolo, Suvana et al. 2003).

## **4.2 Selektiver Agonismus am rsst<sub>2A</sub>**

Bei Überexpression von GRK2 wurde durch SOM230-Stimulation eine selektive Phosphorylierung von Thr<sup>356</sup> und Thr<sup>359</sup> herbeigeführt, während Thr<sup>353</sup> und Thr<sup>354</sup> unphosphoryliert blieben. Durch Behandlung mit Octreotid oder Somatostatin wurden alle vier Threonine des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs, unabhängig von der Überexpression von GRK2 oder GRK3, phosphoryliert. Anscheinend nimmt der rsst<sub>2A</sub> nach Bindung von SOM230 eine Konformation ein, in der zwei Threonine des Motivs für die GRKs unzugänglich sind. Hinzu kommen die soeben diskutierten Unterschiede von SOM230 zu Octreotid und SS-14 in Bezug auf die Agonist-induzierte  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung und rsst<sub>2A</sub>-Internalisierung. Diese Befunde zeigen, dass es sich um eine Agonist-selektive Aktivierung des rsst<sub>2A</sub> handelt. Abbildung 21 fasst die Unterschiede in der Regulation des rsst<sub>2A</sub> zwischen SOM230 und den vollen Agonisten zusammen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit belegt wurden. Aber auch für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren häufen sich die Befunde für Agonist-selektive Aktivierung. Die alte Vorstellung von einem Einfachen An-/Aus-Modus des Rezeptors ist damit überholt. Vergleichbar dem SOM230 am rsst<sub>2A</sub> verhält sich Morphin am  $\mu$ -Opioid-Rezeptor (MOR): Morphin aktiviert den Rezeptor, phosphoryliert diesen, im Gegensatz zu anderen Agonisten, nur an einer Phosphorylierungsstelle und induziert auch keine Internalisierung. Die vollständige Phosphorylierung des MOR durch

Morphin-Behandlung kann allerdings durch GRK2-Überexpression erreicht werden (Zhang, Ferguson et al. 1998; Schulz, Mayer et al. 2004). Der Chemokin-Rezeptor CCR7 wird Agonist-selektiv durch seine endogenen Liganden CCL19 und CCL21 reguliert. Im Gegensatz zu CCL21 führt CCL19 zu einer robusten Rezeptor-Phosphorylierung, -Desensibilisierung, -Internalisierung und -Degradierung (Kohout, Nicholas et al. 2004; Zidar, Violin et al. 2009).

Auch am humanen  $ss_{2A}$  zeigte sich, dass SOM230 eine schwächere Internalisierung des Rezeptors induziert, als das für Somatostatin und Octreotid der Fall ist (Lesche, Lehmann et al. 2009). Da die Selektivität des SOM230 am Ratten-Rezeptor einen drastischen Unterschied erzielt, eignet sich dieses Modell zur Untersuchung der molekularen Mechanismen des selektiven Agonismus besonders gut.



**Abb. 21: Schematische Darstellung der Agonist-selektiven  $rsst_{2A}$ -Regulation.** Der *mittig* dargestellte Rezeptor entspricht dem Ruhezustand. Nach der Stimulation mit SS-14 oder Octreotid (*grüner Ligand*) wird das G-Protein aktiviert und der Rezeptor durch die GRK2 und GRK3 an allen vier Threoninen des  $^{353}TTETQRT^{359}$ -Motivs phosphoryliert. Dies hat eine Komplexbildung mit  $\beta$ -Arrestin-2 zufolge und danach kommt es zur Internalisierung des Rezeptors. Der Rezeptor kehrt an die Membran zurück (recycelt) und ist wieder im Ruhezustand. Nach der Stimulation mit SOM230 (*roter Ligand*) wird das G-Protein aktiviert, der Rezeptor innerhalb des  $^{353}TTETQRT^{359}$ -Motivs höchstens am Thr<sup>356</sup> und Thr<sup>359</sup> phosphoryliert. Es kommt zu keiner Komplexbildung mit  $\beta$ -Arrestin-2 und zu keiner  $rsst_{2A}$ -Internalisierung. Das  $^{353}TTETQRT^{359}$ -Motiv ist aus Gründen der besseren Lesbarkeit verkehrt herum dargestellt.

In dieser Arbeit wurden Daten zum selektiven Signalverhalten der verglichenen Agonisten generiert. Es wurde die ERK-Aktivierung untersucht, zu der es auch durch SOM230-Behandlung kommen kann. Diese erschien, genauso wie jene die von der

<sup>353</sup>AAEAQRA<sup>359</sup>-Mutante hervorgerufene, schwächer als die von SS-14 am Wildtyp-rsst<sub>2A</sub> induzierte. Hier könnte eine Quantifizierung der mittels Western-Blot-Analyse gewonnen pERK-Signale aufschlussreich sein. Gegen eine Abhängigkeit der ERK-Aktivierung von dem Phosphorylierungs-Status des <sup>353</sup>TTETQRT<sup>359</sup>-Motivs spricht, dass in Anwesenheit des G $\alpha_i$ -Blockers Pertussis-Toxin keine ERK-Aktivierung induzierbar war. Es soll in weiterführenden Arbeiten nach anderen Signalwegen gesucht werden, bei denen Unterschiede zwischen SOM230- und SS-14-Stimulation auf eine eventuell bisher unbekannte  $\beta$ -Arrestin-Regulation schließen lassen.

Naheliegend sind zukünftige Untersuchungen über die Desensitisierung, die durch die Phosphorylierung der vier Threonine verstärkt werden könnte. Hier könnte sich ein weiterer Unterschied zwischen Octreotid und SOM230, das denn rsst<sub>2A</sub> aufgrund der ausbleibenden Phosphorylierung weniger stark desensibilisieren sollte, ergeben. Es könnte sich auch ein differenzierteres Bild, wie es kürzlich für den MOR gefunden wurde, ergeben. Die MOR-Agonisten Morphin und DAMGO induzieren eine Desensibilisierung über zwei distinkte Mechanismen: Morphin über einen heterologen, PKC $\alpha$ -vermittelten und DAMGO über einen homologen, GRK-vermittelten Mechanismus (Bailey, Oldfield et al. 2009).

### 4.3 SOM230 ist ein Partialagonist

Octreotid unterdrückt, abhängig von der Präsenz des sst<sub>2</sub>, die hormonelle Hypersekretion von neuroendokrinen Tumoren (Asnacios, Courbon et al. 2008; Plockinger, Albrecht et al. 2008). SOM230 wurde entwickelt, um die gleichen Eigenschaften wie Octreotid zu haben, allerdings erweitert um die Affinität an mehreren Somatostatin-Rezeptoren und damit erweiterten klinischen Möglichkeiten (Weckbecker, Lewis et al. 2003).

Die rsst<sub>2A</sub>-Regulation und Aktivierung durch SOM230 sollte in dieser Arbeit eingehend untersucht werden und mit derjenigen der Vorgängersubstanz Octreotid verglichen werden. Die G $\alpha_i$ -Aktivierung war entsprechend der Bindungsaffinität von SOM230 an den Rezeptor mit der von SS-14 und Octreotid vergleichbar: Die halbmaximale Bindungsaffinität ist etwa fünfmal höher für SOM230 (2,35) als für SS-14 (0,59) und Octreotid (0,45), welches sogar besser als der natürliche Agonist bindet. Das spiegelt

sich auch in der halbmaximalen Inhibition ( $IC_{50}$ ) der cAMP-Anreicherung der Substanzen wieder: Diese ist etwa fünfmal höher für SOM230 (1,91) im Vergleich zu SS-14 (0,48) und Octreotid (0,39) (Pöll et al., akzeptiert). Somit ist der erste Schritt nach der Rezeptoraktivierung der drei Substanzen vergleichbar. Es zeigte sich jedoch, dass SOM230 keine oder nur eine minimale  $rsst_{2A}$ -Internalisierung und  $^{353}TTETQRT^{359}$ -Phosphorylierung induziert. Die folgenden Befunde über die verminderte Fähigkeit von SOM230 zum  $\beta$ -Arrestin-2-Transport, zur ausbleibenden  $rsst_{2A}$ -Internalisierung und vor allem der GRK2- und GRK3-Überexpression, die nur eine partielle Phosphorylierung des  $^{353}TTETQRT^{359}$ -Motivs erlaubte, deuten auf Unterschiede in der Rezeptor-Konformation hin, deren Konsequenzen auf das Signalverhalten des Rezeptors noch unklar bleiben. Somit ist auch nicht klar, welche Folgen der gefundene partialagonistische Effekt von SOM230 in Gegenwart eines vollen Agonisten hat. SOM230 inhibierte die SS-14- sowie Octreotid-induzierte Phosphorylierung und Internalisierung des  $rsst_{2A}$ . Zusammengenommen mit den weiteren festgestellten physiologischen Unterschieden zu den vollen Agonisten, insbesondere dem klinisch eingesetzten Octreotid, ergeben sich mögliche klinische Konsequenzen: Tumore, die hauptsächlich  $sst_2$  exprimieren und lang anhaltend auf Octreotid ansprechen, sollten auch weiterhin so behandelt werden. Dies trifft zum Beispiel auf Wachstumshormon-sekretierende Adenome zu. Denn die partialagonistischen Eigenschaften von SOM230 könnten bei einer Koadministration beider Substanzen den klinischen Nutzen von Octreotid vermindern. Jedoch sollten Tumore, bei denen ein Abfall der Wirkung von Octreotid zu beobachten ist und die eine hohe Expression von  $sst_5$  aufweisen, auf SOM230-Behandlung ansprechen. Beispielsweise Octreotid-resistente Wachstumshormon-ausschüttende Adenome oder auch Karzinoide.

Bedeutende Unterschiede wurden in Bezug auf die  $\beta$ -Arrestin-Mobilisierung gefunden: SOM230 war ohne Überexpression von GRK2 nicht in der Lage,  $\beta$ -Arrestin-2 an die Plasmamembran zu rekrutieren. Nach der Stimulation mit SS-14 wurde das überexprimierte  $\beta$ -Arrestin-2 vollständig an die Membran rekrutiert. Da  $\beta$ -Arrestin für die Desensibilisierung des Rezeptors aber auch für die  $\beta$ -Arrestin-vermittelte Signalweiterleitung von Bedeutung ist, sind Unterschiede in der Antwort der Tumorzellen wahrscheinlich. Diese könnten die in der Einleitung vorgestellten

Unterschiede, die in klinischen Studien und Tierversuchsstudien für längerfristige Administrationen von Octreotid zu SOM230 gefunden wurden, erklären. Ein erster Ansatz zu weiterführenden Erkenntnissen in dieser Richtung sind die vorläufigen Befunde über die eventuell abgeschwächte ERK-Aktivierung durch SOM230.

Es wurde in verschiedenen Zelllinien und auch *in vivo* gezeigt, dass SOM230 den  $rsst_{2A}$  nicht zu internalisieren vermag. Es könnte sich als Glücksfall erweisen, dass dies für den humanen  $sst_2$  nur beschränkt zutrifft: dieser zeigt lediglich eine verminderte Internalisierung nach SOM230-Behandlung. Schließlich ist die Internalisierung des Rezeptors bedeutend für die Möglichkeit zur Tumor-Bildgebung und -Radioliganden-Therapie. Nichtsdestotrotz könnte Octreotid für diese klinischen Ansätze besser geeignet sein als SOM230.

Die festgestellten Unterschiede zum humanen Rezeptor limitieren die klinische Bedeutung der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse am Ratten-Somatostatin-Rezeptor 2A. Gegenwärtig werden in dieser Arbeitsgruppe am  $hsst_2$  Untersuchungen über den selektiven Agonismus von SOM230 im Vergleich zu Octreotid und SS-14 durchgeführt, aus denen sich bessere Rückschlüsse auf den klinischen Einsatz von SOM230 ziehen lassen sollten.

#### **4.4 Vermittlung der $^{353}TTETQRT^{359}$ -Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatase 1 $\beta$**

Für einige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurde die Aktivität von Phosphatasen postuliert, welche die Agonist-induzierte Phosphorylierung am Rezeptor entfernen. Es wurde entweder aufgrund von Inhibitor-Studien auf verschiedene Phosphatasen geschlossen, oder es wurden Phosphatase-Interaktionen mit dem untersuchten GPCR oder mit an diesen assoziierten Proteinen gezeigt, ohne eine Phosphatase-Aktivität am Rezeptor selbst nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit konnten die anfänglichen Befunde der Blockade der Dephosphorylierung durch Phosphatase-Inhibitoren durch siRNA-Studien vertieft werden: Es gelang nicht nur die Identifizierung einer Phosphatase, der PP1, sondern auch gleich der einzigen am phosphorylierten  $^{353}TTETQRT^{359}$ -Motiv aktiven katalytischen Untereinheit dieser Phosphatase, der PP1C $\beta$ .

Einen solchen Befund hat es bislang nicht nur für den  $rsst_{2A}$ , sondern für alle GPCRs noch nicht gegeben und er weist somit einen hohen Neuigkeitswert auf. Die Dephosphorylierung schien in Membrannähe stattzufinden, wie immuncytochemische Daten nahe legen. Die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung lässt ebenfalls auf eine membrannahe Dephosphorylierung schließen, da der Rezeptor zum Zeitpunkt der hauptsächlichen Dephosphorylierung, noch nicht weiter in das Zellinnere internalisiert war. Zum einen ist für eine funktionelle PP1 mindestens eine Variante der regulatorischen PP1-Untereinheiten vonnöten. Zum anderen sollte diese die Eigenschaft haben, die Phosphatase an die Membran oder sogar direkt an den  $rsst_{2A}$  zu transferieren. Die Identifikation für eine oder mehrerer solcher regulatorischer PP1-Untereinheiten wäre ein weiterer Schritt zum Verständnis der bislang wenig untersuchten Regulation der GPCR-Dephosphorylierung. Ein Kandidat wäre Spinophilin, ein Multidomänen-Protein, das neben seiner Fähigkeit, als regulatorische Untereinheit die PP1 zu binden, eine F-Actin-Binde-Domäne und eine PDZ-Proteinbinde-Domäne besitzt, auch mit  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren ( $\alpha_{1B}$  und  $\alpha_2$ ) und dem D2-Dopamin-Rezeptoren interagieren kann. Allerdings wurde für die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren keine Phosphatase-Aktivität der PP1 festgestellt, sondern nur indirekte Regulationen über so genannte Regulatoren der G-Protein-Signalweitergabe (RGS) (Wang, Zhao et al. 2004; Wang, De Arcangelis et al. 2008). Der Phosphorylierungsstatus der AMPA- und NMDA-Rezeptoren wird jedoch durch diesen Komplex gesteuert. Spinophilin fungiert dabei als Gerüst- und Lokalisierungs-Protein, durch das die PP1 in dendritische Dornen transferiert und aktiviert wird (Hu, Huang et al. 2007; Kelker, Dancheck et al. 2007). Aufgrund unserer Befunde scheint ein so gearteter Mechanismus für den  $rsst_{2A}$  und viele andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wahrscheinlich zu sein.

In weiterführenden Arbeiten soll zum einen ein erster Schritt zum genaueren Verständnis der Regulation der  $rsst_{2A}$ -Dephosphorylierung gemacht werden, indem eine für diesen Mechanismus regulatorische PP1-Untereinheit identifiziert werden soll. Zum anderen soll die funktionelle Relevanz der Dephosphorylierung, beispielsweise über siRNA-Studien, untersucht werden. Einer Hypothese zu folge, wäre die Dephosphorylierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren essentiell für den Rücktransport des Rezeptors an die Membran.



## 5 Literaturverzeichnis

- Ahn, S., S. K. Shenoy, et al. (2004). "Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor." J Biol Chem **279**(34): 35518-25.
- Asnacios, A., F. Courbon, et al. (2008). "Indium-111-pentetreotide scintigraphy and somatostatin receptor subtype 2 expression: new prognostic factors for malignant well-differentiated endocrine tumors." J Clin Oncol **26**(6): 963-70.
- Ausubel, F. M. (2002). Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. New York, Wiley.
- Bailey, C. P., S. Oldfield, et al. (2009). "Involvement of PKCalpha and G-protein-coupled receptor kinase 2 in agonist-selective desensitization of mu-opioid receptors in mature brain neurons." Br J Pharmacol **158**(1): 157-64.
- Beaulieu, J. M., S. Marion, et al. (2008). "A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior." Cell **132**(1): 125-36.
- Beaulieu, J. M., T. D. Sotnikova, et al. (2005). "An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior." Cell **122**(2): 261-73.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Brazeau, P., W. Vale, et al. (1973). "Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone." Science **179**(68): 77-9.

- Broglia, F., M. Papotti, et al. (2007). "Brain-gut communication: cortistatin, somatostatin and ghrelin." Trends Endocrinol Metab **18**(6): 246-51.
- Bruns, C., I. Lewis, et al. (2002). "SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antiseecretory profile." Eur J Endocrinol **146**(5): 707-16.
- Byk, T., M. Bar-Yaacov, et al. (1993). "Regulatory arrestin cycle secures the fidelity and maintenance of the fly photoreceptor cell." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 1907-11.
- Cescato, R., S. Schulz, et al. (2006). "Internalization of sst2, sst3, and sst5 receptors: effects of somatostatin agonists and antagonists." J Nucl Med **47**(3): 502-11.
- Ceulemans, H. and M. Bollen (2004). "Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button." Physiol Rev **84**(1): 1-39.
- Chauvin, S., M. Bencsik, et al. (2002). "Parathyroid hormone receptor recycling: role of receptor dephosphorylation and beta-arrestin." Mol Endocrinol **16**(12): 2720-32.
- Chinkers, M. (2001). "Protein phosphatase 5 in signal transduction." Trends Endocrinol Metab **12**(1): 28-32.
- Cohen, P. T., A. Philp, et al. (2005). "Protein phosphatase 4--from obscurity to vital functions." FEBS Lett **579**(15): 3278-86.
- de Bruin, C., R. A. Feelders, et al. (2009). "Somatostatin and dopamine receptors as targets for medical treatment of Cushing's Syndrome." Rev Endocr Metab Disord **10**(2): 91-102.

- DeWire, S. M., S. Ahn, et al. (2007). "Beta-arrestins and cell signaling." Annu Rev Physiol **69**: 483-510.
- Dewire, S. M., J. Kim, et al. (2008). "{beta}-Arrestin-mediated Signaling Regulates Protein Synthesis." J Biol Chem **283**(16): 10611-20.
- Donangelo, I. and S. Melmed (2005). "Treatment of acromegaly: future." Endocrine **28**(1): 123-8.
- Evans, B. J., Z. Wang, et al. (2008). "Physical association of GPR54 C-terminal with protein phosphatase 2A." Biochem Biophys Res Commun **377**(4): 1067-71.
- Fedele, M., I. De Martino, et al. (2007). "SOM230, a new somatostatin analogue, is highly effective in the therapy of growth hormone/prolactin-secreting pituitary adenomas." Clin Cancer Res **13**(9): 2738-44.
- Fischer, T., C. Doll, et al. (2008). "Reassessment of sst2 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-1." J Clin Endocrinol Metab **93**(11): 4519-24.
- Garcia, P. D. and R. M. Myers (1994). "Pituitary cell line GH3 expresses two somatostatin receptor subtypes that inhibit adenylyl cyclase: functional expression of rat somatostatin receptor subtypes 1 and 2 in human embryonic kidney 293 cells." Mol Pharmacol **45**(3): 402-9.
- Gardner, B., Z. F. Liu, et al. (2001). "The role of phosphorylation/dephosphorylation in agonist-induced desensitization of D1 dopamine receptor function: evidence for a novel pathway for receptor dephosphorylation." Mol Pharmacol **59**(2): 310-21.
- Guillermet-Guibert, J., H. Lahlou, et al. (2005). "Physiology of somatostatin receptors." J Endocrinol Invest **28**(11 Suppl International): 5-9.

- Hanyaloglu, A. C. and M. V. Zastrow (2008). "Regulation of GPCRs by Endocytic Membrane Trafficking and Its Potential Implications." Annu Rev Pharmacol Toxicol **48**: 537-568.
- Heilker, R., M. Wolff, et al. (2009). "G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach." Drug Discov Today **14**(5-6): 231-40.
- Hipkin, R. W., J. Friedman, et al. (1997). "Agonist-induced desensitization, internalization, and phosphorylation of the sst2A somatostatin receptor." J Biol Chem **272**(21): 13869-76.
- Hipkin, R. W., Y. Wang, et al. (2000). "Protein kinase C activation stimulates the phosphorylation and internalization of the sst2A somatostatin receptor." J Biol Chem **275**(8): 5591-9.
- Honkanen, R. E. and T. Golden (2002). "Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era?" Curr Med Chem **9**(22): 2055-75.
- Hu, X. D., Q. Huang, et al. (2007). "Differential regulation of AMPA receptor trafficking by neurabin-targeted synaptic protein phosphatase-1 in synaptic transmission and long-term depression in hippocampus." J Neurosci **27**(17): 4674-86.
- Innamorati, G., H. Sadeghi, et al. (1998). "Transient phosphorylation of the V1a vasopressin receptor." J Biol Chem **273**(12): 7155-61.
- Iyer, V., T. M. Tran, et al. (2006). "Differential phosphorylation and dephosphorylation of beta2-adrenoceptor sites Ser262 and Ser355,356." Br J Pharmacol **147**(3): 249-59.

- Jacobs, S. and S. Schulz (2008). "Intracellular trafficking of somatostatin receptors." Mol Cell Endocrinol **286**(1-2): 58-62.
- Janssens, V., S. Longin, et al. (2008). "PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail)." Trends Biochem Sci **33**(3): 113-21.
- Kelker, M. S., B. Dancheck, et al. (2007). "Structural basis for spinophilin-neurabin receptor interaction." Biochemistry **46**(9): 2333-44.
- Kelly, E. (2006). "G-protein-coupled receptor dephosphorylation at the cell surface." Br J Pharmacol **147**(3): 235-6.
- Kohout, T. A. and R. J. Lefkowitz (2003). "Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization." Mol Pharmacol **63**(1): 9-18.
- Kohout, T. A., S. L. Nicholas, et al. (2004). "Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7." J Biol Chem **279**(22): 23214-22.
- Krueger, K. M., Y. Daaka, et al. (1997). "The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification." J Biol Chem **272**(1): 5-8.
- Krupnick, J. G. and J. L. Benovic (1998). "The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation." Annu Rev Pharmacol Toxicol **38**: 289-319.
- Lahlou, H., J. Guillermet, et al. (2004). "Molecular signaling of somatostatin receptors." Ann N Y Acad Sci **1014**: 121-31.

- Lefkowitz, R. J. (2000). "The superfamily of heptahelical receptors." Nat Cell Biol **2**(7): E133-6.
- Lefkowitz, R. J. and S. K. Shenoy (2005). "Transduction of receptor signals by beta-arrestins." Science **308**(5721): 512-7.
- Lelouvier, B., G. Tamagno, et al. (2008). "Dynamics of somatostatin type 2A receptor cargoes in living hippocampal neurons." J Neurosci **28**(17): 4336-49.
- Lesche, S., D. Lehmann, et al. (2009). "Differential effects of octreotide and pasireotide on somatostatin receptor internalization and trafficking in vitro." J Clin Endocrinol Metab **94**(2): 654-61.
- Lewis, I., W. Bauer, et al. (2003). "A novel somatostatin mimic with broad somatotropin release inhibitory factor receptor binding and superior therapeutic potential." J Med Chem **46**(12): 2334-44.
- Liu, Q., M. S. Bee, et al. (2009). "Site specificity of agonist and second messenger-activated kinases for somatostatin receptor subtype 2A (Sst2A) phosphorylation." Mol Pharmacol **76**(1): 68-80.
- Liu, Q., R. Cescato, et al. (2005). "Receptor signaling and endocytosis are differentially regulated by somatostatin analogs." Mol Pharmacol **68**(1): 90-101.
- Liu, Q., D. A. Dewi, et al. (2008). "Distinct phosphorylation sites in the SST2A somatostatin receptor control internalization, desensitization, and arrestin binding." Mol Pharmacol **73**(2): 292-304.
- Lodish, H. F. (2004). Molecular cell biology. New York, W.H. Freeman.

- Lohse, M. J. (1993). "Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization." Biochim Biophys Acta **1179**(2): 171-88.
- Luttrell, L. M. and R. J. Lefkowitz (2002). "The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals." J Cell Sci **115**(Pt 3): 455-65.
- Ma, P., Y. Wang, et al. (2005). "Pharmacokinetic-pharmacodynamic comparison of a novel multiligand somatostatin analog, SOM230, with octreotide in patients with acromegaly." Clin Pharmacol Ther **78**(1): 69-80.
- Marchese, A., M. M. Paing, et al. (2008). "G Protein-Coupled Receptor Sorting to Endosomes and Lysosomes." Annu Rev Pharmacol Toxicol **48**: 601-629.
- Moore, C. A., S. K. Milano, et al. (2007). "Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins." Annu Rev Physiol **69**: 451-82.
- Oakley, R. H., S. A. Laporte, et al. (2001). "Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*." J Biol Chem **276**(22): 19452-60.
- Oakley, R. H., S. A. Laporte, et al. (2000). "Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors." J Biol Chem **275**(22): 17201-10.
- Oberg, K. (2005). "Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract: recent advances in molecular genetics, diagnosis, and treatment." Curr Opin Oncol **17**(4): 386-91.
- Oldham, W. M. and H. E. Hamm (2008). "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 60-71.

- Park, P. S., D. T. Lodowski, et al. (2008). "Activation of g protein-coupled receptors: beyond two-state models and tertiary conformational changes." Annu Rev Pharmacol Toxicol **48**: 107-41.
- Patel, Y. C. (1999). "Somatostatin and its receptor family." Front Neuroendocrinol **20**(3): 157-98.
- Pfeiffer, M., T. Koch, et al. (2001). "Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A)." J Biol Chem **276**(17): 14027-36.
- Pfeiffer, M., T. Koch, et al. (2002). "Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization." J Biol Chem **277**(22): 19762-72.
- Pierce, K. L., R. T. Premont, et al. (2002). "Seven-transmembrane receptors." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 639-50.
- Pippig, S., S. Andexinger, et al. (1995). "Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization." Mol Pharmacol **47**(4): 666-76.
- Pitcher, J. A., E. S. Payne, et al. (1995). "The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8343-7.
- Plockinger, U., S. Albrecht, et al. (2008). "Selective loss of somatostatin receptor 2 in octreotide-resistant growth hormone-secreting adenomas." J Clin Endocrinol Metab **93**(4): 1203-10.



- Premont, R. T. and R. R. Gainetdinov (2007). "Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins." Annu Rev Physiol **69**: 511-34.
- Rapacciuolo, A., S. Suvarna, et al. (2003). "Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways." J Biol Chem **278**(37): 35403-11.
- Reubi, J. C. (1997). "Regulatory peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy." Q J Nucl Med **41**(2): 63-70.
- Rinke, A., H. H. Muller, et al. (2009). "Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group." J Clin Oncol **27**(28): 4656-63.
- Saslow, S. B., M. D. O'Brien, et al. (1997). "Octreotide inhibition of flushing and colonic motor dysfunction in carcinoid syndrome." Am J Gastroenterol **92**(12): 2250-6.
- Schmid, H. A. (2008). "Pasireotide (SOM230): development, mechanism of action and potential applications." Mol Cell Endocrinol **286**(1-2): 69-74.
- Schmid, H. A. and A. P. Silva (2005). "Short- and long-term effects of octreotide and SOM230 on GH, IGF-I, ACTH, corticosterone and ghrelin in rats." J Endocrinol Invest **28**(11 Suppl International): 28-35.
- Schonbrunn, A. (2008). "Selective agonism in somatostatin receptor signaling and regulation." Mol Cell Endocrinol **286**(1-2): 35-9.
- Schulz, S., D. Mayer, et al. (2004). "Morphine induces terminal micro-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375." Embo J **23**(16): 3282-9.

- Schwartkop, C. P., H. J. Kreienkamp, et al. (1999). "Agonist-independent internalization and activity of a C-terminally truncated somatostatin receptor subtype 2 (delta349)." J Neurochem **72**(3): 1275-82.
- Shukla, A. K., J. D. Violin, et al. (2008). "Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 9988-93.
- Sontag, E. (2001). "Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling." Cell Signal **13**(1): 7-16.
- Spurney, R. F. (2001). "Regulation of thromboxane receptor (TP) phosphorylation by protein phosphatase 1 (PP1) and PP2A." J Pharmacol Exp Ther **296**(2): 592-9.
- Steele, F. R., T. Washburn, et al. (1992). "Drosophila retinal degeneration C (rdgC) encodes a novel serine/threonine protein phosphatase." Cell **69**(4): 669-76.
- Stumm, R. K., C. Zhou, et al. (2004). "Somatostatin receptor 2 is activated in cortical neurons and contributes to neurodegeneration after focal ischemia." J Neurosci **24**(50): 11404-15.
- Tran, T. M., J. Friedman, et al. (2007). "Characterization of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation: Comparison with the rate of resensitization." Mol Pharmacol **71**(1): 47-60.
- Tulipano, G. and S. Schulz (2007). "Novel insights in somatostatin receptor physiology." Eur J Endocrinol **156 Suppl 1**: S3-11.
- Tulipano, G., R. Stumm, et al. (2004). "Differential beta-arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes." J Biol Chem **279**(20): 21374-82.

- van der Hoek, J., W. W. de Herder, et al. (2004). "A single-dose comparison of the acute effects between the new somatostatin analog SOM230 and octreotide in acromegalic patients." J Clin Endocrinol Metab **89**(2): 638-45.
- Vinos, J., K. Jalink, et al. (1997). "A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function." Science **277**(5326): 687-90.
- Virshup, D. M. and S. Shenolikar (2009). "From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover." Mol Cell **33**(5): 537-45.
- Wang, Q., J. Zhao, et al. (2004). "Spinophilin blocks arrestin actions in vitro and in vivo at G protein-coupled receptors." Science **304**(5679): 1940-4.
- Wang, Y., V. De Arcangelis, et al. (2008). "Norepinephrine- and Epinephrine-induced Distinct 2-Adrenoceptor Signaling Is Dictated by GRK2 Phosphorylation in Cardiomyocytes." J Biol Chem **283**(4): 1799-807.
- Weckbecker, G., U. Briner, et al. (2002). "SOM230: a new somatostatin peptidomimetic with potent inhibitory effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in rats, primates, and dogs." Endocrinology **143**(10): 4123-30.
- Weckbecker, G., I. Lewis, et al. (2003). "Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects." Nat Rev Drug Discov **2**(12): 999-1017.
- Zhang, J., S. S. Ferguson, et al. (1998). "Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 7157-62.

Zidar, D. A., J. D. Violin, et al. (2009). "Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(24): 9649-54.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	6
Abb. 2	Der Carboxyl-Terminus des rsst <sub>2A</sub>	12
Abb. 3	Der anti-psst2A detektiert die Agonist-selektive Phosphorylierung des rsst <sub>2A</sub>	29
Abb. 4	Auf die Agonist-induzierte Phosphorylierung folgt die rsst <sub>2A</sub> -Internalisierung	30
Abb. 5	Agonist-gesteuerte rsst <sub>2A</sub> -Internalisierung in INS1-Zellen	31
Abb. 6	Agonist-selektive rsst <sub>2A</sub> -Internalisierung und -Phosphorylierung <i>in vivo</i>	32
Abb. 7	Die Phosphorylierung des <sup>353</sup> TTETQRT <sup>359</sup> -Motivs wird nicht durch Second-Messenger-aktivierte Kinasen vermittelt	33
Abb. 8	GRK2 und GRK3 vermitteln die Agonist-induzierte rsst <sub>2A</sub> -Phosphorylierung	35
Abb. 9	Das <sup>353</sup> TTETQRT <sup>359</sup> -Motiv wird vollständig phosphoryliert	36
Abb. 10	Agonist-selektive Muster der rsst <sub>2A</sub> -Phosphorylierung	38
Abb. 11	Agonist-selektive rsst <sub>2A</sub> -Phosphorylierung und -Internalisierung	39
Abb. 12	Partialagonistische Eigenschaften von SOM230	40
Abb. 13	SS-14 und SOM230 induzieren unterschiedliche Muster der β-Arrestin-Translokation	42
Abb. 14	Die ERK-Aktivierung wird über Gα <sub>i</sub> vermittelt	44
Abb. 15	Die <sup>353</sup> AAEAQRA <sup>359</sup> -Mutante zeigt eine verlangsamte und reduzierte Internalisierung	46
Abb. 16	Calyculin A, aber nicht Okadainsäure blockt die rsst <sub>2A</sub> -Dephosphorylierung	48
Abb. 17	Immuncytochemischer Nachweis der Inhibition der rsst <sub>2A</sub> -Dephosphorylierung durch Calyculin A	49
Abb. 18	siRNA- <i>Knockdown</i> der katalytischen Untereinheiten von PP1 und PP2A	52
Abb. 19	siRNA- <i>Knockdowns</i> von PP4 und PP5 zeigen keinen Effekt auf die rsst <sub>2A</sub> -Dephosphorylierung	54
Abb. 20	Der <i>Knockdown</i> der PP1Cβ führt zu einer lang anhaltenden Phosphorylierung des rsst <sub>2A</sub> an der Membran	55
Abb. 21	Schematische Darstellung der Agonist-selektiven rsst <sub>2A</sub> -Regulation	62

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AP-2	Adapter-Protein-2
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i> , Zelllinie aus den Ovarien des chinesischen Hamsters
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
DMEM	Dulbecco's modified Eagle-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	Escherischia coli
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , verstärkt grün-fluoreszierendes Protein
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FKS	Fötales Kälberserum
G418	Geniticinsulfat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GH	<i>Growth hormone</i> , Wachstumshormon
GH <sub>3</sub>	Ratten-Hypophysen-Adenom-Zelllinie
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanosin-5'-triphosphat-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase(n)
GRP	G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Phosphatase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HCl	Salzsäure
HEK293	humane embryonale Nieren-293-Zellen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie

HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IGF-1	<i>Insulin-like-growth-factor-1</i>
INS1-Zellen	Ratten Insulinom-Zelllinie
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertoni
min	Minute(n)
MOR	μ-Opioid-Rezeptor
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht
NEB	New England Biolabs
OA	Okadainsäure, <i>okadaic acid</i>
OD	optische Dichte
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ	Postsynaptische Dichte 95/Discs large/Zonula occludentes-1
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PPP	Phosphoprotein-Phosphatasen
PVDF	Polyvinylidenfluorid-Membran
RDGC	<i>retinal degeneration C</i> , retinale Degeneration C
RGS	<i>Regulators of G protein signalling</i> , Regulatoren der G-Protein-Signalweitergabe
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat

siRNA	<i>small Interfering ribonucleic acid</i> , kleine interferierende Ribonukleinsäure
SOM230	Pasireotid
SS-14 (-28)	Somatostatin-14 (-28)
sst	Somatostatin-Rezeptor
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TP	Thromboxan-Rezeptor
Tris	Tris-hydroxymethylendiamin



## 6.3 Antikörper

### 6.3.1 Primäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies, Generierung</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller, Quelle</i>
anti-ERK	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:2000	Cell Signaling
anti-GRK2	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1500	Santa Cruz
anti-GRK3	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:500	Santa Cruz
anti-GRK5	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:300	Santa Cruz
anti-GRK6	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:300	Santa Cruz
anti-pERK	Maus, monoklonal	WB: 1:500	Cell Signaling
anti-PP1-pan	Maus, monoklonal	WB: 1:2000	Santa Cruz
anti-PP2A $\alpha/\beta$	Maus, monoklonal	WB: 1:10000	BD Biosciences
anti-PP4/PPX	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:400	Santa Cruz
anti-PP5	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:400	Santa Cruz
anti-psst2A	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:1000	Gramsch
anti-psst2A (Thr353/Thr354)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:500	Affinitätsreinigung anti-psst2A
anti-psst2A (Thr356/Thr359)	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:500	Affinitätsreinigung anti-psst2A
anti-sst2A	Kaninchen, monoklonal	ICC: 1:100 IHC: 1:100 WB: 1:200	Epitomics
anti-T7	Kaninchen, polyklonal	ELISA: 1 $\mu$ g/ml	Gramsch

**Tab. 1: Verwendete primäre Antikörper.** IF: Immunfluoreszenz, IHC: Immunhistochemie, WB: Western-Blot.

### 6.3.2 Sekundäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller, Quelle</i>
anti-Kaninchen Alexa488-gekoppelt	Ziege	IF: 1:1000	Invitrogen
anti-Kaninchen HRP-gekoppelt	Ziege	WB: 1:5000 ELISA: 1:500	Amersham
anti-Maus HRP-gekoppelt	Ziege	WB: 1:5000	Amersham
anti-Ziege HRP-gekoppelt	Ziege	WB: 1:5000	Santa Cruz
biotinylierter Anti-Kaninchen	Ziege	IHC: 1:20	Vector

**Tab. 2: Verwendete sekundäre Antikörper.** IF: Immunfluoreszenz, IHC: Immunhistochemie, WB: Western-Blot.

## 6.4 cDNA-Expressionskonstrukte

<i>Konstrukt</i>	<i>Vektor</i>	<i>Verwendung</i>
β-Arrestin-2-EGFP		Heterologe Expression
hGRK2	pcDNA3.1	Heterologe Expression
hGRK3	pcDNA3.1	Heterologe Expression
hGRK5	pcDNA3.1	Heterologe Expression
Leervektor	pcDNA3.1	Kontroll-Transfektion
rsst2A-AAEAQRA	pcDNA3.1	Stabile heterologe Expression
rsst2A-AAEAQRT	pcDNA3.1	Stabile heterologe Expression
rsst2A-AAETQRT	pcDNA3.1	Stabile heterologe Expression
rsst2A-T7	pcDNA3.1	Heterologe Expression Stabile heterologe Expression
rsst2A-TTEAQRA	pcDNA3.1	Stabile heterologe Expression

**Tab. 3: Verwendete cDNA-Expressionskonstrukte.** Der pcDNA3.1 wurde bei Invitrogen erworben.

## 6.5 Primer

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Verwendung</i>
rsst2A_TTEAQRA_fwd	AATGAGACCACGGAGGCCAGAG GACCTCCTC	TTEAQRT-Mutante herstellen
rsst2A_TTEAQRA_rev	GAGGAGGGTCCTCTGGGCTCCG TGGTCTCATT	TTEAQRT-Mutante herstellen
rsst2A_AAETQRT_fwd	AATGAGGCCGCGGAGACCCAGAG GACCTC	AAETQRT-Mutante herstellen
rsst2A_AAETQRT_rev	GAGGGTCCTCTGGGTCTCCGCGG CCTCATT	AAETQRT-Mutante herstellen
rsst2A-AAEAQRA_fwd	GCGGAGGCCAGAGGGCCCTCCT CAATGGA	AAEAQRA-Mutante herstellen
rsst2A-AAEAQRA_rev	TCCATTGAGGAGGGCCCTCTGGG CCTCCGC	AAEAQRA-Mutante herstellen
BGH XXL	CTGGCAACTAGAAGGCACAGTCG AGGCTGATCAG	Sequenzierung rsst <sub>2A</sub> - Konstrukte
sst2-for-3	GGCCTCCGGAGCAACCAGTGGGG	Sequenzierung rsst <sub>2A</sub> - Konstrukte

**Tab. 4: Verwendete Primer für die Sequenzierung und Mutagenese.** Die mit fwd gekennzeichneten Primer sind Vorwärtsprimer, die mit rev gekennzeichneten Rückwärtsprimer.

## 6.6 siRNA

<i>Bezeichnung</i>	<i>Humanes Zielprotein</i>	<i>mRNA-Zielsequenz</i>
GRK2	GRK2	5'-CGGGAGAUCUUCGACUCAUA-3'
GRK3	GRK3	5'-AAGCAAGCUGUAGAACACGUA-3'
GRK5	GRK5	5'-AAGCAAGCUGUAGAACACGUA-3'
GRK6	GRK6	5'- AACACCUUCAGGCAAUACCGA-3'
PPP1CA	PP1 katalytische UE $\alpha$	5'- AAGAGACGCUACAACAUCAAA-3'
PPP1CB	PP1 katalytische UE $\beta$	5'-UACGAGGAUGUCGUCCAGGAA-3'
PPP1CC	PP1 katalytische UE $\gamma$	5'-AACAU CGACAGCAUUAUCCAA-3'
PPP2CA	PP2A katalytische UE $\alpha$	5'-AUGGAAUUAGAUGACACUUA-3'
PPP2CB	PP2A katalytische UE $\beta$	5'-CCGACAAAUUACCCAAGUAUA-3'
PP4	PP4/PPX	5'-CGGACAAUCGACCGAAAGCAA-3'
PP5	PP5	5'-CUCGUGGAAACCACACUCAAA-3'
Nichtbindende Kontrolle	-	5'- GCUUAGGAGCAUUAGUAAA-3'

**Tab. 4: Verwendete siRNA-Oligos.** Alle Sequenzen sind gegen humane mRNAs gerichtet.

## 6.7 Lebenslauf

- 28.3.1980 Geboren in München
- 1986-1990 Farinelli-Grundschule in München
- 1990-2000 Willi-Graf-Gymnasium in München mit Abitur beendet
- 2001-2003 Studium der Biologie und Vordiplom an der Universität Konstanz
- 2003-2006 Studiengang Neurobiologie an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
- 2005-2006 Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Neurobiologie in Magdeburg
- 26.09.2006 Abschluss Diplom im Fach Biologie (Studiengang Neurobiologie)
- 7.12.2006 Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Stefan Schulz
- 1.1.2008 Weiterführung der Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Institutsdirektor Prof. Dr. Stefan Schulz
- 6.3.2009 Ernst-und-Berta-Scharrer-Preis 2009 der Deutschen Endokrinen Gesellschaft

## 6.8 Veröffentlichung

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeiten wurden von *Molecular Endocrinology* zur Publikation akzeptiert:

Pöll, F., Lehmann, D., et al. "Pasireotide and Octreotide Stimulate Distinct Patterns of sst<sub>2A</sub> Somatostatin Receptor Phosphorylation Revealed by Phosphosite-specific Antibodies." *Mol Endocrinol*, *akzeptiert*.

Des Weiteren wurden Teile dieser Arbeit mit dem Ernst-und-Berta-Scharrer-Preis 2009 der Deutschen Endokrinen Gesellschaft ausgezeichnet.

## **6.9 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Jena, Dezember 2009